

**Bindung und Synthese von
Hepatitis B-Virus surface Antigen
durch primäre Tupaiahepatozyten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Peter Kraß
aus Steinfurt/Westfalen

Gießen 2006

Aus dem Institut für Medizinische Virologie
des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Leiter: Prof. Dr. phil. nat. Dr. h. c. Wolfram H. Gerlich

Gutachter: Prof. Dr. Dr. W.H. Gerlich

Gutachter: Prof. Dr. L. Fink

Tag der Disputation: 20.02.2007

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
1. Einleitung.....	6
1.1 Hepatitis B.....	6
1.2 Das Hepatitis B-Virus (HBV).....	7
1.3 Tupaia.....	11
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit.....	12
 2. Material und Methoden.....	 13
2.1 Tiere.....	13
2.2 Zellkultur.....	13
2.2.1 Primäre Zellen.....	13
2.2.2 Zelllinien.....	18
2.3 Infektionsversuche.....	19
2.4 Aufnahmeversuche.....	20
2.5 Immunfluoreszenz / Immunzytochemie.....	22
 3. Ergebnisse.....	 27
3.1 Methoden zur Isolation und Kryopräservierung primärer Tupaia- und Rattenhepatozyten.....	27
3.1.1 Isolation.....	28
3.1.2 Kryopräservierung.....	32
3.2 Charakterisierung von Proteinexpression und funktioneller Differenzierung primärer Tupaiahepatozyten.....	35
3.2.1 Expression von Tubulin und Vimentin.....	35
3.2.2 Funktioneller Nachweis hepatozytärer Oberflächenrezeptoren.....	37
3.2.3 Immunzytochemische Darstellung von Zellstrukturen.....	42
3.3 Infektion primärer Tupaiahepatozyten mit dem humanen Hepatitis B-Virus....	44
3.3.1 Infektion mit gereinigten HBV-Präparationen.....	45
3.3.2 Infektion durch HepG2.2.15-Zellkulturüberstand.....	49
3.3.3 Infektion durch temporäre Co-Kultivierung mit HepG2.2.15-Zellen.....	51
3.3.4 Inhibition der HBV-Infektion primärer Tupaiahepatozyten durch neutralisierende Antikörper.....	52

3.3.5	Nachweis von Hepatitis B-Virus core Antigen (HBcAg) in primären Tupaiahepatozyten.....	53
3.4	Bindung und Aufnahme von HBsAg.....	54
3.4.1	Bindung und Aufnahme von HBsAg durch primäre Tupaiahepatozyten.....	55
3.4.1.1	Nachweis der Bindung / Aufnahme von „nativem“ HBsAg.....	55
3.4.1.2	Darstellung des oberflächlich gebundenen HBsAg.....	57
3.4.1.3	Verbleib des aufgenommenen HBsAg.....	60
3.4.1.4	Inhibition der Bindung von HBsAg an Tupaiahepatozyten.....	61
3.4.1.5	Bindung / Aufnahme von nicht-nativem (modifiziertem) HBsAg - desialylierte subvirale Partikel.....	65
3.4.1.6	Inhibition der Bindung desialylierter SVP an primäre Tupaiahepatozyten.....	67
3.4.1.7	Bindung / Aufnahme von nicht-nativem (modifiziertem) HBsAg - trypsinierte und V8-verdaute subvirale Partikel.....	69
3.4.1.8	Bindung / Aufnahme von nicht-nativem (modifiziertem) HBsAg - desialylierte trypsinierte subvirale Partikel.....	70
3.4.1.9	Intrazelluläre Verteilungsmuster der unterschiedlichen SVP.....	71
3.4.2	Bindung und Aufnahme von HBsAg durch HepG2-Zellen.....	72
4.	Diskussion.....	74
4.1	Isolation und Kryopräservierung primärer Hepatozyten.....	74
4.1.1	Isolation.....	75
4.1.2	Kryopräservierung.....	76
4.2	Proteinexpression und funktionelle Differenzierung primärer Hepatozyten.....	81
4.2.1	Expression von Zytoskelettfilamenten.....	81
4.2.2	Funktionalität von Oberflächenrezeptoren.....	83
4.2.3	Vergleichende Gegenüberstellung der eingesetzten immunzytochemischen und immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweismethoden.....	85
4.3	Infektion primärer Tupaiahepatozyten mit dem humanen Hepatitis B-Virus....	86
4.3.1	Infektion mit gereinigten HBV-Präparationen.....	87
4.3.2	Infektion durch HepG2.2.15-Zellkulturüberstand.....	97
4.3.3	Infektion durch temporäre Co-Kultivierung mit HepG2.2.15-Zellen.....	100
4.3.4	Inhibition der HBV-Infektion primärer Tupaiahepatozyten durch neutralisierende Antikörper.....	101

4.4	Bindung und Aufnahme von HBsAg.....	104
4.4.1	Bindung und Aufnahme von HBsAg durch primäre Tupaiahepatozyten.....	105
4.4.1.1	Bindung und Aufnahme von nativem HBsAg.....	106
4.4.1.2	Differenzierung zwischen Bindung und Aufnahme von HBsAg.....	107
4.4.1.3	Verbleib des aufgenommenen HBsAg.....	108
4.4.1.4	Inhibition der Bindung von HBsAg an primäre Tupaiahepatozyten.....	109
4.4.1.5	Bindung / Aufnahme von desialylierten subviralen Partikeln durch primäre Tupaiahepatozyten.....	112
4.4.1.6	Bindung / Aufnahme trypsinierter und V8-verdauter subviraler Partikel.....	113
4.4.2	Bindung und Aufnahme von HBsAg durch HepG2-Zellen.....	114
5.	Zusammenfassung	115
5.	Summary	116
6.	Literaturverzeichnis	117
7.	Abkürzungsverzeichnis	131
8.	Lebenslauf	134
9.	Danksagung	136
10.	Erklärung	138

1. Einleitung

1.1 Hepatitis B

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan des Menschen. Zu den häufigsten Erkrankungen dieses Organs zählen virale Entzündungen (Hepatitiden), ausgelöst durch primär hepatotrope Viren, den sogenannten Hepatitisviren. Derzeit unterscheidet man fünf verschiedene Hepatitisviren (A bis E), die allesamt unterschiedlichen Virusfamilien angehören. Die durch sie ausgelösten Erkrankungen ähneln sich zwar in der klinischen Symptomatik, unterscheiden sich jedoch wesentlich in der Pathogenese und dem Krankheitsverlauf; Hepatitis B- und C-Virus-Infektionen können chronifizieren.

Eine der weltweit bedeutendsten Virushepatitiden ist die Hepatitis B; nach aktuellen Schätzungen gelten weltweit 300 bis 420 Millionen Menschen als chronisch HBV-infiziert, entsprechend 5 bis 7% der Weltbevölkerung. Noch wesentlich mehr, etwa 2 Milliarden, weisen Zeichen einer abgelaufenen Hepatitis B auf. In Deutschland sind ca. 0,5% der Bevölkerung chronisch infiziert, bei etwa 5-7% läßt sich eine stattgehabte Infektion nachweisen (Epidemiologisches Bulletin des Robert-Koch-Instituts, 37/2004). HBV wird vornehmlich durch Blut oder Blutprodukte übertragen, die häufigsten Infektionswege in der westlichen Welt sind Sexualkontakte, gefolgt von invasiven medizinischen Eingriffen und intravenösem Drogengebrauch. In Südostasien und Afrika hingegen kommt der perinatalen Übertragung sowie der Akquisition im frühen Kindesalter die größte Bedeutung zu.

Nach einer Inkubationszeit von 45-180 Tagen kann sich die akute Infektion klinisch mit Müdigkeit, Druckgefühl im rechten Oberbauch, Muskel- und Gelenkschmerzen, Hepatomegalie und leichtem Fieber manifestieren. Bei nur etwa 30% der Erwachsenen nimmt die akute Infektion einen ikterischen Verlauf an, bei Kindern noch seltener. Auch subklinische Infektionen kommen vor. HBV selbst ist dabei nicht zytopathogen, die eigentliche Erkrankung beruht auf einer Immunpathogenese. Laborchemisch imponiert bei der akuten Erkrankung die starke Erhöhung der Leber-Transaminasen GPT (Glutamat-Pyruvat-Transaminase) und GOT (Glutamat-Oxalat-Transaminase), weiterhin kommt es zur Erhöhung von γ -GT (γ -Glutamyl-Transferase), alkalischer Phosphatase und Bilirubin. Bei fulminanten Verläufen treten Zeichen des akuten Leberversagens mit hepatischer Enzephalopathie und Gerinnungsstörungen auf; zu 70% enden diese Verläufe letal.

Chronische HBV-Infektionen mit einem Verlauf von mehr als 6 Monaten weisen häufig eine diskretere Klinik auf; im Laufe mehrerer Jahre können sie jedoch zur Leberzirrhose und, häufig darauf basierend, zum hepatozellulären Karzinom (HCC) führen.

Die Diagnosestellung erfolgt in der Regel serologisch über den Nachweis verschiedener Virusantigene und gegen sie gerichteter Antikörper, bzw. über den Nachweis von HBV-DNA. Leberbiopsische Untersuchungen können prinzipiell auch zum Infektionsnachweis herangezogen werden, jedoch sollten sie wegen ihrer Invasivität ausschließlich bei besonderen Fragestellungen zur Anwendung kommen.

Die Therapie der akuten Hepatitis B ist in der Regel eine rein symptomatische, während bei chronischen Infektionen eine antivirale Therapie mit Interferon- α , Lamivudin oder Adefovir durchgeführt werden kann.

Zur Immunprophylaxe einer HBV-Infektion stehen Impfstoffe zur aktiven und passiven Immunisierung zur Verfügung, die bei korrekter Anwendung sehr effektiv und sicher sind. Auch Kondome können nicht nur vor Schwangerschaft und AIDS schützen, sondern auch vor einer sexuell akquirierten HBV-Infektion.

1.2 Das Hepatitis B-Virus (HBV)

a) Aufbau. Das Hepatitis B-Virus des Menschen (HBV) wurde im Wesentlichen in den 1960er Jahren durch die Untersuchungen von BLUMBERG *et al.* (1965, 1967), PRINCE (1968) und DANE *et al.* (1970) entdeckt. Es ist ein ca. 52 nm großes, umhülltes Virus mit partiell doppelsträngigem DNA-Genom; es gehört der Familie Hepadnaviridae, Genus Orthohepadnaviridae, an. Derzeit sind 8 unterschiedliche Genotypen (A bis H) bekannt. Andere Hepadnaviren kommen unter anderem bei Walddarmtieren (*woodchuck hepatitis virus*, WHV) und Pekingtonen (*duck hepatitis B virus*, DHBV) vor. Diese Tiere und Viren dienen auch als Modellsysteme für die HBV-Infektion, da sich mit HBV neben Menschen nur Schimpansen und Makaken infizieren lassen. Auch *in vitro* zeigten sich bislang nur primäre humane Hepatozyten suszeptibel für eine HBV-Infektion, während praktisch alle „klassischen“ Zelllinien hierfür refraktär sind, mit Ausnahme der erst kürzlich beschriebenen Zelllinie HepaRG. Damit fehlten lange Zeit ein einfaches *in vitro*- und ein Kleintiermodell zum Studium der HBV-Infektion, bis in den Arbeiten von SU (1987), YAN *et al.* (1996) und WALTER *et al.* (1996) die Infizierbarkeit von Tupaia mit HBV *in vitro* und *in vivo* beschrieben wurde. Generell zeichnen sich alle Hepadnaviren durch eine sehr hohe Speziespezifität aus, Kreuzinfektionen sind nur innerhalb sehr enger Grenzen möglich.

Das Virus besteht aus einem ikosaedrischen Kapsid, „Core“ genannt, das aus Hepatitis B-Core-Antigen (HBcAg) besteht. Im Core befindet sich das partiell doppelsträngige DNA-Genom mit ca. 3200 Basenpaaren, sowie eine viruscodierte reverse Transkriptase. Umhüllt wird das Core von einer Plasmamembran, die dem endoplasmatischen Retikulum der Wirtszelle entstammt. In diese Membran sind Hepatitis B Oberflächenproteine eingelagert, die zusammen das Hepatitis B *surface* Antigen (HBsAg) ausmachen. Das häufigste und kleinste dieser Proteine ist das SHBs. Durch die aminoternale Anlagerung einer weiteren Proteindomäne, der PräS2-Domäne, entsteht das MHBs-Protein, welches wiederum durch die aminoternale Anlagerung der sogenannten PräS1-Domäne zum LHBs-Protein erweitert werden kann. Die S- und PräS2-Domäne sind teilweise *N*- und *O*-glykosyliert. Durch Unterschiede in der Primärstruktur des SHBs lassen sich verschiedene HBsAg-Subtypen differenzieren, die jedoch nicht eindeutig nur einem Genotyp zugeordnet werden können (vgl. BARTHOLOMEUSZ u. SCHAEFER 2004), weswegen diese Klassifikation weitgehend verlassen wurde. Infizierte Hepatozyten synthetisieren wesentlich mehr Virushüllen als Corepartikel. Das überschüssige Hüllmaterial wird in Form von sphärischen oder länglichen subviralen Partikeln (SVP) in das Blut abgegeben. Weiterhin codiert das Virusgenom für zwei Nicht-Strukturproteine, das HBe-Antigen (HBeAg), welches von infizierten Zellen sezerniert wird, und das HBx-Protein. Die Funktionen beider Proteine sind zu großen Teilen noch unklar. Eine Übersicht über den Virusaufbau gibt Abb. 1-1.1.

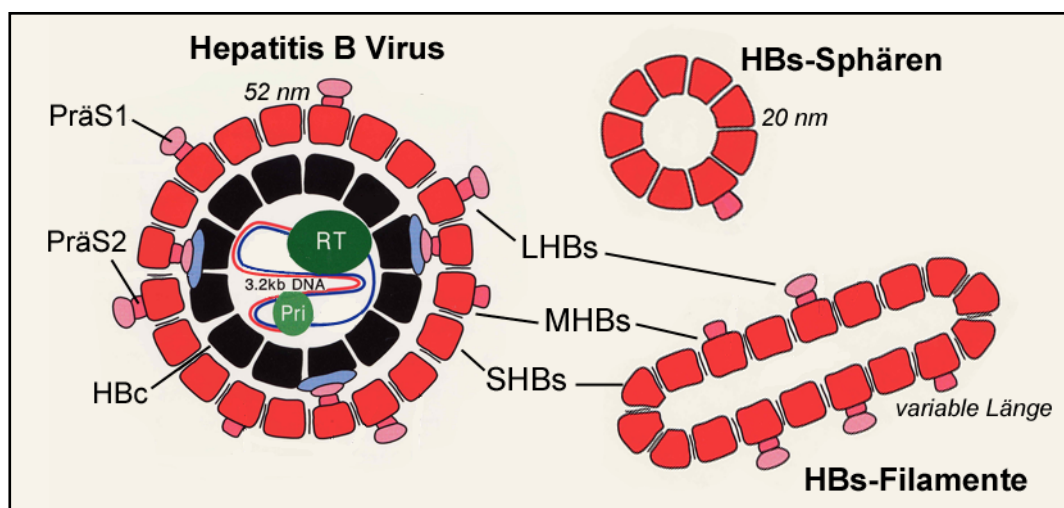


Abb. 1-1.1: Strukturmodell des HBV-Partikels und der beiden Formen subviraler Partikel, HBs-Sphären und -Filamente. Dargestellt sind die drei Hüllproteine SHBs, MHBs und LHBs mit den PräS1- und PräS2-Domänen, und das Core-Protein HBc. Innerhalb des Cores befindet sich das partiell doppelsträngige DNA-Genom sowie die reverse Transkriptase inklusive Primerdomäne.

Diese Abbildung wurde freundlicherweise von Herrn Prof. W.H. GERLICH, Institut für Medizinische Virologie an der JLU Gießen, zur Verfügung gestellt.

b) Viraler Lebenszyklus. HBV infiziert nahezu ausschließlich Hepatozyten, indem es über seine Hüllproteine an einen oder mehrere noch unbekannte zelluläre Rezeptoren bindet, und über noch ungeklärte Mechanismen in die Zelle aufgenommen wird. Bei dem Avihepadnavirus DHBV wurde Carboxypeptidase D (gp180) als ein notwendiger, aber alleine nicht ausreichender Rezeptor identifiziert. Dieses Ergebnis ließ sich jedoch nicht auf HBV übertragen. Nach der Aufnahme in die Zielzelle wird das Core in das Zytoplasma hinein freigesetzt und zur Membran des Zellkerns transportiert, wo es geöffnet wird und das Virusgenom in das Karyoplasma entläßt. Dort wird die virale DNA in die Form der sogenannten *cccDNA* (*covalently closed circular DNA*) gebracht, die als Vorlage für die Synthese verschiedener mRNAs dient. Im Zytoplasma findet die Translation der mRNA-Stränge für das HBcAg und die reverse Transkriptase statt, am endoplasmatischen Retikulum werden die drei Hüllproteine des HBsAg synthetisiert. Unter anderem wird auch eine prägenomische RNA hergestellt, die mitsamt der reversen Transkriptase in das Core eingeschlossen wird (Assemblierung des Core-Partikels), um dort zur Virus-DNA umgeschrieben zu werden. Das assemblierte Core-Partikel wird nun einerseits zum endoplasmatischen Retikulum transportiert, wo es seine Hülle erhält, und nach Durchlaufen des Golgi-Apparates als komplettes Viruspartikel in den Blutkreislauf sezerniert wird. Andererseits werden einige Core-Partikel auch zum Zellkern geleitet, wo sie wiederum die Virus-DNA freisetzen. Auf diese Weise sammeln sich im Laufe der Infektion immer mehr virale Genome im Zellkern an. Eine Übersicht über diese Vorgänge gibt Abb. 1-1.2.

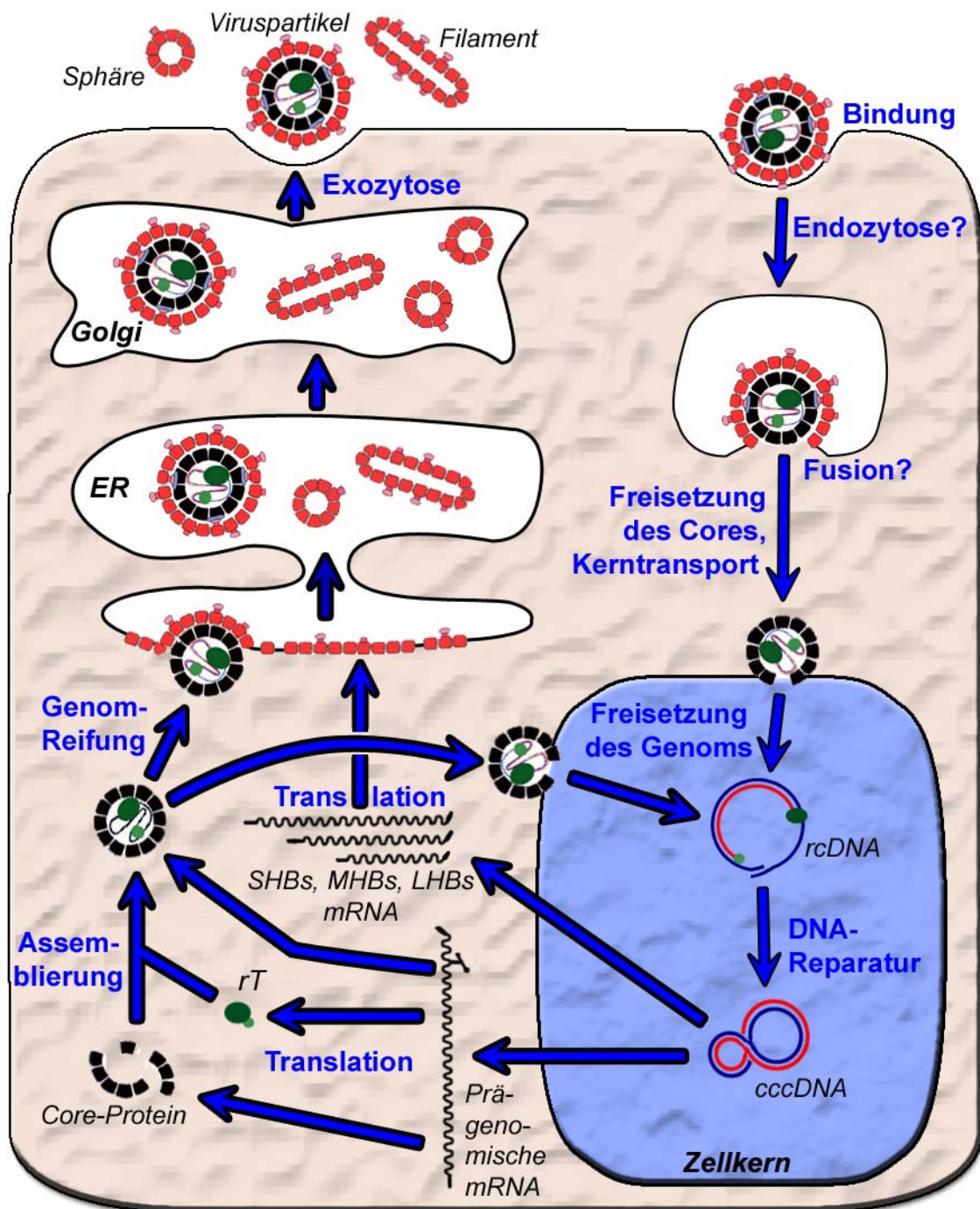


Abb. 1-1.2: Intrazellulärer Lebenszyklus des HBV. Dargestellt sind die Strukturproteine von Virushülle und Kapsid (HBs- u. HBcAg), die viruscodierte reverse Transkriptase (rT), sowie die verschiedenen viralen Nukleinsäuren (rcDNA, cccDNA, mRNAs). Die Synthese der Nichtstrukturproteine HBeAg und HBx ist zur Vereinfachung nicht dargestellt. Die ersten Phasen des Lebenszyklus (Endozytose, Fusion, Freisetzung von Core und Genom) sind noch weitgehend hypothetisch. ER = endoplasmatisches Retikulum. Abbildung nach GERLICH u. SCHAEFER (2002), modifiziert.

1.3 Tupaia

Tupaia, Spitzhörnchen, leben natürlicherweise in den tropischen Berg- und Regenwäldern Süd- und Südostasiens. Ihren Namen haben sie durch ihr hörnchenartiges Aussehen erhalten, ansonsten bilden sie aber eine eigene biologische Ordnung, *Scandentia*, Familie *Tupaiaidae*. Zunächst wurden Tupaia den Primaten zugeordnet, diese Einteilung konnte jedoch wissenschaftlich nicht aufrecht erhalten werden; mittlerweile ist klar, daß sie phylogenetisch eher den Hasen (*Lagomorpha*) nahestehen als den Primaten (SCHMITZ *et al.* 2000), und Tupaia und Primaten eher einen gemeinsamen Vorfahren haben. Man unterscheidet mehrere Spitzhörnchen-Arten, darunter das ostasiatische Spitzhörnchen *Tupaia belangeri*, das etwa 20 cm lang (mit Schwanz ca. 40 cm), und etwa 200 g schwer wird (Abb. 1-1.3). Tupaia können in Gefangenschaft gehalten und gezüchtet werden; sie werden vor allem als Versuchstiere in den Bereichen Neurobiologie und Verhaltensbiologie eingesetzt. Die Entdeckung, daß *Tupaia belangeri* suszeptibel für die Infektion mit HBV ist, wurde wohl erstmals von SU (1987) beschrieben. Mittlerweile gibt es auch Berichte über die Suszeptibilität von Tupaiahepatozyten für das Hepatitis B-Virus des Wollaffen (WMHBV) (KÖCK *et al.* 2001). Diese Tatsache ist primär etwas verwunderlich, da die Hepadnavirus-Infektionen eigentlich hoch speziesspezifisch sind, nun aber auch in einem Tier propagiert werden können, das einer ganz anderen biologischen Ordnung angehört. Ein natürlicherweise bei Tupaia vorkommendes Hepadnavirus wurde im Übrigen noch nie beschrieben, und auch im Rahmen dieser Arbeit fand sich kein Anhalt dafür.



Abb. 1-1.3: Zwei *Tupaia belangeri* beim „Begrüßungslecken“.
Diese Abbildung wurde freundlicherweise von Herrn Prof. D. VON HOLST, Bayreuth, zur Verfügung gestellt.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Der Einsatz von primären Tupaiahepatozyten als Modellsystem für die HBV-Infektion des Menschen hat nach wie vor noch einen sehr experimentellen Charakter, und ist noch nicht befriedigend etabliert. Diese Arbeit soll in mehreren Bereichen Beiträge zur genaueren Charakterisierung dieses Infektionssystems leisten.

Erstens ist die Verfügbarkeit von Tupaiahepatozyten noch unzureichend. Dies liegt einerseits an der geringen Verbreitung von Tupaiakolonien außerhalb Asiens, andererseits aber auch an den noch verbesserungsfähigen Methoden zur Hepatozytengewinnung. Da der erstgenannte Faktor nur schwer zu beeinflussen ist, soll im Rahmen dieser Arbeit die Verfügbarkeit von Hepatozyten dadurch verbessert werden, daß die bestehenden biologischen Ressourcen optimal genutzt werden.

Zweitens ist nur sehr wenig darüber bekannt, welche zellbiologischen Eigenschaften Tupaiahepatozyten unter *in vitro*-Bedingungen aufweisen, das heißt über welchen Proteinbesatz sie verfügen, in welchem Differenzierungszustand sie sich befinden, und welche biologischen bzw. biochemischen Funktionen sie auszuüben in der Lage sind. Hierüber sollen in dieser Arbeit nähere Informationen gesammelt werden.

Drittens wurde die HBV-Infektion primärer Tupaiahepatozyten bislang weder immunzytochemisch noch immunfluoreszenzmikroskopisch dargestellt; dies soll eines der Hauptanliegen dieser Arbeit sein. Durch die Gegenüberstellung der intrazellulären Verteilungsmuster verschiedener Virusproteine in dem Infektionssystem einerseits, und in der HBV-infizierten menschlichen Leber andererseits, können Rückschlüsse auf die Vergleichbarkeit beider Infektionen gezogen werden, und damit auf die Übertragbarkeit des *in vitro*-Infektionsmodells auf die *in vivo*-Verhältnisse beim Menschen.

Das zentrale Thema dieser Arbeit soll jedoch eine weitere Erforschung der frühen Phasen der HBV-Infektion sein. Gerade die Bindung von HBV an Hepatozyten und die konsekutive Aufnahme des Virus in die Zelle konnten bislang nur unzureichend untersucht werden, aus Mangel an einem praktikablen Infektionssystem. Diesem Umstand ist es vor allem zuzuschreiben, daß sowohl der oder die zellulären HBV-Rezeptoren noch nicht identifiziert werden konnten, als auch nur wenige Kenntnisse über den Aufnahmemechanismus des Virus vorhanden sind. Da mit den primären Tupaiahepatozyten nun ein HBV-Infektionsmodell existiert, soll hier an diesem System die Interaktion der HBV-Oberflächenproteine mit den Hepatozyten zu Beginn des Infektionsvorganges genauer untersucht werden.

2. Material und Methoden

Hinweis: Geschützte Warennamen (Warenzeichen) werden hier nicht besonders kenntlich gemacht. Aus dem Fehlen eines solchen Hinweises kann deshalb nicht geschlossen werden, daß es sich um einen freien Warennamen handelt.

2.1 Tiere. Tupaia (*Tupaia belangeri*) entstammten der Tupaiakolonie, die vom Institut für Anatomie und Zellbiologie an der JLU Gießen von Herrn Dr. VALERIUS unterhalten wird, oder wurden freundlicherweise von Herrn Prof. VON HOLST, Bayreuth, zur Verfügung gestellt. Wistar-Ratten wurden im Tierstall des Mehrzweckinstituts der JLU Gießen gehalten.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Primäre Zellen. Als primäre Zellen wurden vor allem primäre Tupaiahepatozyten (PTH), aber auch primäre Rattenhepatozyten (PRH) verwendet. Die Zellen beider Spezies wurden prinzipiell gleich behandelt, bis auf leichte Unterschiede in der Zusammensetzung der Zellkulturmedien. Die folgenden Ausführungen gelten also für PTH und PRH gleichermaßen.

a) Isolation. Die Isolation primärer Hepatozyten fand nach einer modifizierten Zwei-Schritt Collagenase-Perfusionstechnik statt, die ursprünglich von SEGLEN (1976) beschrieben wurde. Jedes Tier wurde unter tierärztlicher Überwachung durch Begasung mit CO₂ und anschließender Distraction / Hyperextension der kranialen Halswirbelsäule getötet. Nach gründlicher Desinfektion von Fell und Haut durch Abreiben mit 70%iger Ethanollösung wurden Abdominal- und Thoraxhöhle des Tieres von ventral her mit Scheren und Pinzetten in der Mittellinie vollständig eröffnet; dabei wurde zunächst die Haut durchtrennt, anschließend die tieferen Gewebeschichten. In der eröffneten Bauchhöhle wurde im *Ligamentum hepatoduodenale* die Pfortader (*V. portae*) aufgesucht. Das Gefäß wurde mit einer Braunüle (22G 1''; B. Braun Melsungen, Melsungen) punktiert, die Kunststoffkanüle mittels eines Vicryl-Fadens (Ethicon, Norderstedt) in ihrer Lage fixiert, und die Leber hierüber sofort mit 10 ml eiskaltem PBS (*phosphate buffered saline*; Invitrogen, Karlsruhe) gespült, um für den Zeitraum der Präparation den Stoffwechsel der Leberzellen zu reduzieren. Dann wurde die Leber von sämtlichen Ligamenten und Verwachsungsflächen gelöst, und mitsamt der Pfortaderkanüle auf den Lochplattenaufsatz eines Kunststofftrichters gelegt. Dort

wurde sie nun mit Hilfe einer Schlauchpumpe (easyload 3-Rollenpumpe; Masterflex, Gelsenkirchen) mit regulierbarer Fördermenge nach folgendem Schema perfundiert:

- 1.: PBS (Invitrogen) + 12,5 mmol/l EGTA (Sigma, Taufkirchen): 25 min.,
8-10 ml/min, 22°C.
- 2.: PBS: 15 min., 8-10 ml/min, 22°C.
- 3.: Collagenase Hep Plus (Serva Electrophoresis, Heidelberg) 150 mg in 200 ml DMEM (Invitrogen): 30 min., 8-10 ml/min, 37°C.

Alle Lösungen wurden vorher mit Hilfe eines Sprudelsteins mit 100% O₂ oxygeniert; die Collagenase-Lösung wurde im Wasserbad auf 40°C erwärmt, so daß die Temperatur am Organ bei ca. 37°C lag. Nachdem die Perfusionslösungen das Organ durchströmt hatten, wurden sie über den Trichter abgeleitet; das PBS wurde sofort nach der Organpassage verworfen, während die Collagenase-Lösung im Sinne einer rezirkulierenden Perfusion wieder dem Ursprungsbehälter zugeführt wurde (Abb. 2-1.1). Nach Abschluß der Perfusionsphase wurden die Hepatozyten nun mechanisch aus der aufgeweichten Leber herausgelöst. Dazu wurde das Organ mit Skalpell und Pinzette behutsam zerkleinert, die Gewebstücke in der zur Perfusion verwandten Collagenase-Lösung aufgeschwemmt, in einen Standkolben überführt, und auf einem Schüttler für 10 min. bei 37°C und 100 Umdrehungen / min. geschwenkt. Anschließend wurde der Inhalt des Standkolbens langsam durch ein Filter aus Siebdruckgaze (Porengröße 210 µm; Koenen Siebdrucktechnik, München) gegossen. Das Filtrat, eine Suspension von separierten Zellen in der Collagenase-Lösung, wurde in einem 50 ml Falcon-Röhrchen (BD Biosciences, Heidelberg) asserviert und sofort eisgekühlt. Die Zellsuspension wurde nun in einer vorgekühlten Zentrifuge (Eppendorf 5810R, Rotor A4-62; Eppendorf, Hamburg) für 5 min. bei 4°C und 40 x g zentrifugiert, so daß sich am Boden des Falcon-Röhrchens ein Zellpellet bildete. Der Überstand wurde abgenommen, und das Zellpellet in 40 ml eiskaltem DMEM (Invitrogen) vorsichtig resuspendiert. Dieser Zentrifugations-Resuspensions-Zyklus wurde noch zweimal wiederholt, wobei das Zellpellet nach der dritten Zentrifugation allerdings in nur in 5 ml eiskaltem DMEM resuspendiert wurde. Die Zellen in dieser Suspension wurden dann entweder ausplattiert oder eingefroren (siehe unten).

Um die Viabilität der isolierten Zellen zu ermitteln, wurde ein Tropfen der Zellsuspension auf einen Objektträger aufgebracht, und etwa 10 µl Trypanblau (Sigma) hinzugegeben (Trypanblau-Probe); tote Zellen färben sich bei dieser Methode blau an,

während lebende Zellen sich nicht anfärben. Der Anteil toter bzw. lebendiger Zellen wurde durch Auszählen mehrerer Gesichtsfelder unter dem Mikroskop ermittelt.

Zur Bestimmung der Gesamtzahl isolierter Zellen wurde eine kleine Probe der erhaltenen Zellsuspension 1:50 in Zellkulturmedium verdünnt, und in einer NEUBAUER-Zählkammer (LO Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf) ausgezählt.

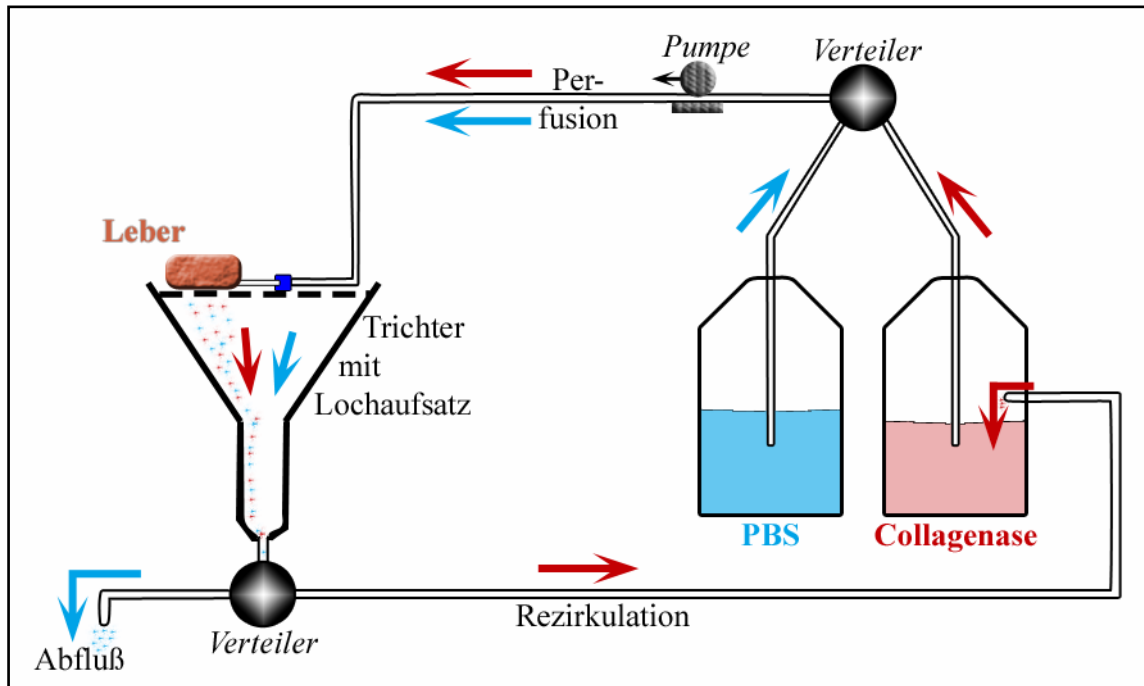


Abb. 2-2.1: Schema zur Perfusion einer Tupaialeber. Dargestellt ist der Aufbau der Perfusionseinheit zur Perfusion der explantierten Leber auf einem Lochtrichter, sowie der Weg der Perfusionslösungen (PBS: Blaue Pfeile; Collagenase: Rote Pfeile). Während das PBS nach der Organpassage abfließt und verworfen wird, wird die Collagenase-Lösung in einem Rezykulations-Kreislauf wieder dem Ursprungsgefäß zugeführt.

b) Kultivierung. In verschiedenen Phasen der Kultivierung primärer Tupaiahepatozyten wurden unterschiedliche, speziell hierfür zusammengestellte Zellkulturmedien (nach GLEBE) eingesetzt.

1.: „Tupaia-Medium“:

Williams' E-Medium (mit GlutaMax I; Invitrogen)

20 mmol/l HEPES (Sigma)

1 g/l Bovines Serumalbumin, kristallisiert (Sigma)

1% ITS-G (entspr. 1,0m g/l Insulin, 0,55g/l Transferrin, 0,67g/l Selen; Invitrogen)

2% DMSO (Dimethylsulfoxid; Sigma)

0,4 mg/l Dexamethason (Sigma)

50 µmol/l Hydrocortison (Sigma)

100 mg/l Gentamicin (Invitrogen)
1 mg/l Amphotericin B (Invitrogen)

2.: „Anheftungsmedium“:

Williams' E-Medium (mit GlutaMax I; Invitrogen)
10% Fetales Kälberserum (PAN Biotech, Aidenbach)
100 mg/l Gentamicin (Invitrogen)
1 mg/l Amphotericin B (Invitrogen)

3.: „Infektionsmedium“:

William' E-Medium (mit GlutaMax I; Invitrogen)
20 mmol/l HEPES (Sigma)
2% DMSO (Sigma)
100 mg/l Gentamicin (Invitrogen)
0,25 mg/l Amphotericin B (Invitrogen)
1 g/l Bovines Serumalbumin, kristallisiert (Sigma)

Nach der Zubereitung wurden alle Medien durch ein 0,22 µm Stericup-Filter (Millipore, Schwalbach) sterilfiltriert und aliquotiert.

Vor dem Ausplattieren der isolierten Zellen wurden Falcon-Zellkulturschalen in verschiedenen Größen (Polystyrol 35 / 60 mm Ø; Multiwell 6 well / 24 well; BD Biosciences) dünn mit Collagen (Collagen Typ I, aus Rattenschwanzsehne, c = 0,8 g/l; BD Biosciences) beschichtet. Zur Herstellung von Deckglaspräparaten wurde je ein Deckgläschen („Assistent“-Deckgläser, 12 mm Ø; Karl Hecht KG, Sondheim) in die Vertiefungen einer 24 well-Zellkulturschale gelegt und collagenisiert.

Zum Ausplattieren wurden die frisch isolierten Zellen nach der letzten Zentrifugation in warmem Anheftungsmedium resuspendiert, und diese Suspension langsam in die collagenisierten Zellkulturschalen pipettiert. Hierzu wurden ausschließlich Falcon-Kunststoffpipetten („Space Saver“ serologische Pipetten; BD Biosciences) verwendet.

Das Anheftungsmedium wurde für 2 bis 4 h belassen, danach wurde es vollständig abgenommen, und durch Tupaia-Medium ersetzt; dieses Medium wurde in der Regel alle drei Tage gewechselt. Bei Infektionsversuchen wurde für den Zeitraum der

Inokulation das Tupaia-Medium durch Infektionsmedium ersetzt, dem zuvor das Virusinokulat zugefügt wurde.

c) Kryopräservation. Zum Einfrieren von isolierten Hepatozyten wurde zunächst ein Gefriermedium hergestellt, das aus folgenden Komponenten bestand:

70% modifizierte *University of Wisconsin solution* (UW-Lösung; nach MAMPRIN *et al.* 2000, modifiziert):

Aqua bidestillata

100 mmol/l Lactobionsäure (Sigma)

25 mmol/l *di*-Kaliumhydrogenphosphat ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$; Merck, Darmstadt)

5 mmol/l Magnesiumsulfat ($MgSO_4 \cdot 7 H_2O$; Merck)

30 mmol/l Raffinose (Sigma)

3 mmol/l Glutathion (Sigma)

1 mmol/l Allopurinol (Sigma)

5% Polyethylenglykol (PEG, MW = 3.350 Da; Sigma)

15 mmol/l Glycin (Roth, Karlsruhe)

100 mg/l Gentamicin (Invitrogen)

0,25 mg/l Amphotericin B (Invitrogen)

Der pH-Wert der Lösung wurde mit konzentrierter Kalilauge (KOH; Merck) auf 7,4 eingestellt, die fertige Lösung durch ein 0,22 µm Stericup-Filter (Millipore) sterilfiltriert.

20% Fetales Kälberserum (PAN Biotech)

10% DMSO (Sigma)

Zum Einfrieren der isolierten Hepatozyten wurde das Zellpellet nach der letzten Zentrifugation in eiskaltem Gefriermedium vorsichtig resuspendiert, und 5 min. auf Eis belassen. Dann wurde die Suspension nochmals behutsam durchmischt, und in Portionen zu 1 ml in Einfrierröhrchen (Nalgene Cryoröhrchen; Nunc, Wiesbaden) gefüllt. Diese Röhrchen wurden sofort in eine -70°C Gefriertruhe gestellt, und am nächsten Tag in einen -165°C Stickstoffbehälter überführt, wo sie bis zum Auftauen belassen wurden.

d) Auftauen. Zum Auftauen eingefrorener primärer Hepatozyten wurde das Einfrierröhrchen aus dem -165°C Stickstoffbehälter geborgen, und im Wasserbad bei 25°C aufgetaut. Sobald das Eis vollständig geschmolzen war, wurde der Röhrcheninhalt (1 ml) in ein eisgekühltes Falcon-Röhrchen (BD Biosciences) überführt, schrittweise 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml eiskaltes Williams' E-Medium (Invitrogen) vorsichtig hinzugegeben, und behutsam durchmischt. Nach jeder Zugabe von Medium wurde die Suspension für 5 min. auf Eis inkubiert. Im Anschluß an diese Verdünnung des Gefriermediums wurde die Zellsuspension für 6 min. bei 4°C und 40 x g zentrifugiert (Eppendorf 5810R, Rotor A4-62; Eppendorf); der entstehende Überstand wurde vollständig abgenommen, und das Zellpellet in 37°C warmen Anheftungsmedium (mit 2% DMSO) resuspendiert. Diese Suspension wurde in collagenisierte Zellkulturschalen gegeben, das Medium wurde nach ca. vier Stunden durch Tupaia-Medium ersetzt. Zur Kontrolle der Zellviabilität wurde vor dem Ausplattieren an einer kleinen Probe eine Trypanblaufärbung durchgeführt.

e) Photodokumentation. Zur Photodokumentation der primären Hepatozytenkulturen wurde ein Zeiss Axiovert 35 Phasenkontrastmikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen) mit einer Contax 167 MT Spiegelreflexkamera (Kyocera, Hamburg) und Ilford HP5 plus schwarz/weiß-Filme (Ilford, Dreieich) verwendet.

Die Bilder der frisch aufgetauten, Trypanblau-gefärbten Hepatozyten wurden an einem Zeiss Axiophot Mikroskop (Carl Zeiss) mit einer Sony 3CCD-Kamera (Sony, Köln) angefertigt; diese beiden Geräte wurden freundlicherweise von Herrn Prof. T. CHAKRABORTY, Institut für Medizinische Mikrobiologie an der JLU Gießen, zur Verfügung gestellt.

2.2.2 Zelllinien. Im Rahmen dieser Arbeit kamen die humanen Hepatomzelllinien HepG2, HepG2.2.15 und HuH7 zum Einsatz.

Die Zelllinie HepG2 ist 1975 aus dem Biopsiematerial eines Hepatoblastoms bei einem 15-jährigen Jungen hervorgegangen (ADEN *et al.* 1979); die Zellen dieser Zelllinie verfügen über zahlreiche differenzierte Leberzellfunktionen, zum Beispiel die Synthese diverser Plasmaproteine (KNOWLES *et al.* 1980). Hepatoblastome sind kindliche Lebertumoren, die nicht mit einer chronischen Virushepatitis assoziiert sind.

HepG2.2.15-Zellen leiten sich von HepG2-Zellen ab, in deren Genom durch stabile Transfektion mehrere HBV-Genome integriert wurden. Diese Zellen produzieren und

sezernieren sowohl HBs-Antigen in Form von subviralen Partikeln, als auch unreife Core-Partikel, sowie komplette, infektiöse Hepatitis B-Viren (SELLS *et al.* 1987, ACS *et al.* 1987).

HuH7-Zellen sind Zellen eines hepatozellulären Karzinoms; sie sind in der Lage, diverse Plasmaproteine zu synthetisieren, unter anderem Albumin, Transferrin, α 1-Antitrypsin, Fibrinogen, Complementfaktoren, und vieles mehr. Anders als einige andere Zelllinien, die aus hepatozellulären Karzinomen hervorgegangen sind, sind sie HBV-negativ (NAKABAYASHI *et al.* 1982).

a) Auftauen und Kultivierung. Die verschiedenen Zelllinien lagen bei -165°C gelagert vor. Bei Bedarf wurde ein Einfrierröhrchen (Nunc) aus dem Stickstofftank entnommen, und im Wasserbad bei 25°C aufgetaut. Sobald das Eis vollständig geschmolzen war, wurde der Inhalt in ein 50 ml Falcon-Röhrchen (BD Biosciences) überführt, und ca. 30 ml eiskaltes DMEM (Invitrogen) hinzugegeben. Diese Suspension wurde für 10 min. bei 4°C mit $200 \times g$ zentrifugiert (Eppendorf 5810R, Rotor A4-62; Eppendorf). Das dadurch entstandene Zellpellet wurde, nach vorsichtiger Abnahme des Überstandes, in warmem DMEM (Invitrogen) + 10% FKS (PAN Biotech) resuspendiert. Die Zellen in dieser Suspension wurden dann, je nach Bedarf, in unterschiedlichen Zellkulturschalen (BD Biosciences) bzw. 24 well- Schalen mit eingelegten collagenisierten Deckgläschen (BD Biosciences / Karl Hecht KG) ausplattiert. Das Zellkulturmedium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert; als Medium wurde DMEM (Invitrogen) mit Penicillin / Streptomycin (PAA, Linz, A) verwendet, dem je nach Versuchsansatz 0 bzw. 5 bzw. 10% FKS (PAN Biotech) zugesetzt wurden.

2.3 Infektionsversuche

a) Viren. Die für den Großteil der Infektionsversuche verwendeten Hepatitis B-Viren stammten aus dem Blutplasma eines freiwilligen Spenders mit einer chronischen Hepatitis B („ID 259“). Im Ursprungsserum waren 2×10^9 HBV-Genome pro ml und 10 $\mu\text{g/ml}$ HBs-Antigen enthalten, außerdem war es HBe-Antigen-positiv. Die Viren entsprachen dem Genotyp D, HBsAg-Subtyp ayw2. Das Blutplasma wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Blutbank des Klinikums der JLU Gießen (Leiter: Prof. G. BEIN), die Bestimmung der Hepatitis B-Marker wurde von Frau U. WEND vorgenommen.

Mittels Sucrosegradienten-Zentrifugation (durchgeführt von Frau S. BROEHL) waren die Viren aus dem Serum hochrein isoliert und konzentriert worden, so daß sie in einer Lösung mit ca. 10^7 HBV-Genomen pro μl vorlagen. Zur Methode des quantitativen Nachweises der HBV-DNA siehe HEERMANN *et al.* (1999).

In einigen Experimenten wurden Hepatitis B-Viren verwendet, die von der Zelllinie HepG2.2.15 produziert wurden. Von diesen Viren ist bekannt, daß sie dem Genotyp D entsprechen (vgl. SELLS *et al.* 1987). Die Konzentrationen von Virus und HBs-Antigen in den verwendeten Zellkulturüberständen sind dem Kapitel 3.2 dieser Arbeit zu entnehmen.

b) Methodik. Soweit direkt bei den Versuchen im Ergebnisteil nicht anders angegeben, fanden die Infektionsversuche mit primären Tupaiahepatozyten nach folgendem Schema statt:

Die zu infizierenden Zellen wurden in 24 well-Zellkulturschalen (BD Biosciences) auf collagenisierten Deckgläschen kultiviert. Am dritten Tag der Kultivierung wurde das Zellkulturmedium durch 500 μl /well „Infektionsmedium“ plus dem jeweiligen Virusinokulat ersetzt. Dieses Medium wurde ca. 15 Stunden (über Nacht) auf den Zellen belassen, anschließend komplett abgenommen, die Zellen dreimal mit Zellkulturmedium gewaschen, und anschließend für mehrere Tage in Tupaia-medium weiterkultiviert.

2.4 Aufnahmeversuche

a) Substrate.

Subvirale Partikel (HBs-Sphären und -Filamente, trypsinisierte und V8-verdaute HBs-Sphären, desialylierte HBs-Sphären, trypsinisierte desialylierte HBs-Sphären):

Alle Arten subviraler Partikel lagen bereits hochrein aus humanem Spenderserum isoliert vor; die Viren in diesem Serum wiesen den HBV-Genotyp D, HBsAg-Subtyp ayw2 auf. Bestimmte SVP-Präparationen waren bereits schon desialyliert bzw. mit Trypsin und V8 verdaut worden. Die Desialylierung war mit Sialidase aus *Arthrobacter ureafaciens* durchgeführt worden. Alle SVP-Präparationen waren von Herrn Dr. D. GLEBE und Frau S. BROEHL hergestellt worden.

Bovines Fetuin (Sigma), bovines Asialofetuin (Sigma)

Bovines lactosyliertes Albumin (Sigma), bovines maltosyliertes Albumin (Sigma)

Bovines lactosyliertes FITC-Albumin (Sigma)

Humanes AlexaFluor 594-Transferrin (Molecular Probes, Leiden, NL)

HuPreS2-48^{myr}, DuPreS2-41^{myr}: Freundliches Geschenk von PD Dr. Stephan URBAN, Heidelberg (vgl. URBAN u. GRIPON 2002)

Anti-HBs polyklonal (Schaf): Eigenproduktion des Instituts für Medizinische Virologie der JLU Gießen (s. GLEBE *et al.* 2003)

b) Methodik. Wegen der zahlreichen unterschiedlichen Versuchsansätze sind genauere Angaben zu den Aufnahmeversuchen dem Ergebnisteil dieser Arbeit zu entnehmen. Das Grundprinzip der verschiedenen Experimente war jedoch folgendes:

Primäre Tupaiahepatozyten wurden drei Tage lang in 24 well-Zellkulturschalen auf collagenisierten Deckgläschen kultiviert; am dritten Tag fand der Aufnahmeversuch statt. Dazu wurde zunächst eine feuchte Kammer (Abb. 2-4.1) vorbereitet: An den Rand einer 150 mm Zellkulturschale (BD Biosciences) wurde ein zusammengerolltes, mit Wasser durchtränktes Zellstofftuch gelegt, der Boden der Schale wurde mit Wasser benetzt, und darauf ein ca. 10 x 7 cm großes Stück Parafilm-Folie (Parafilm M; Brand, Wertheim) gelegt. Auf der Rückseite dieser transparenten Folie wurden vorher 8-10 einzelne Versuchsfelder eingezeichnet. Dann wurden die verschiedenen Inkubationsmedien angesetzt, die alle aus DMEM (Invitrogen) + 1 g/l bovines Serumalbumin (Albumin Fraktion V; Roth) bestanden, plus dem jeweils zu untersuchenden Substrat bzw. Substraten. Von diesen Inkubationsmedien wurden jeweils 40 µl in ein Versuchsfeld auf der Parafilm-Folie pipettiert. Nun wurden mit Hilfe einer feinen, spitzen Pinzette die Deckgläschen aus den Zellkulturschalen geborgen, einmal kurz zum Waschen in warmes Zellkulturmedium (DMEM; Invitrogen) getaucht, und dann so auf die 40 µl-Tropfen Inkubationsmedium auf der Parafilm-Folie gelegt, daß die Zellen tragenden Seite nach unten wies. Die so präparierte feuchte Kammer wurde nun für die Dauer der Inkubation, in der Regel eine Stunde, bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Zum Abschluß der Inkubation wurden die Deckgläschen mit einer Pinzette wieder vorsichtig von der Parafilm-Folie abgehoben, dreimal in warmem DMEM gewaschen, und anschließend sofort fixiert.

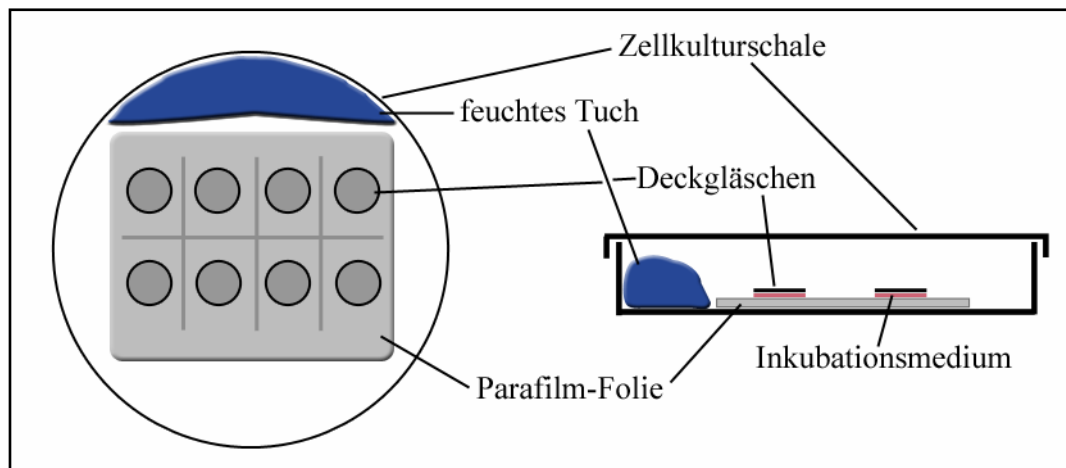


Abb. 2-4.1: Schematische Darstellung einer „feuchten Kammer“, wie sie für Aufnahmeversuche und bei der Herstellung von Deckglaspräparaten für die Immunfluoreszenz und Immunzytochemie verwendet wurde.
Links: Aufsicht. Rechts: Seitenansicht.

2.5. Immunfluoreszenz / Immunzytochemie

a) Lösungen. Für die Immunfluoreszenz und die Immunzytochemie wurden einige Lösungen gleichermaßen verwendet:

1.: *Phosphate buffered saline* pH 7,4 (Phosphatpuffer, PBS):

Aqua bidestillata

0,2 g/l Kaliumchlorid (KCl; Merck)

0,2 g/l Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4 ; Merck)

8,0 g/l Natriumchlorid (NaCl ; Merck)

1,435 g/l Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; Merck)

2.: Paraformaldehyd-Lösung (3% w/v):

6,0 g Paraformaldehyd (PFA) (Merck)

200 ml PBS

konz. Kalilauge (KOH; Merck)

6 g PFA-Pulver wurden in 150 ml Aqua bidest. unter ständigem Rühren und Zugabe einiger Tropfen Kalilauge bei 50-55°C gelöst. Nachdem diese Lösung klar wurde, wurde sie mit 20 ml 10x PBS sowie Aqua bidest. auf 200 ml Volumen aufgefüllt.

3.: **Triton X-100-Lösung (0,1% v/v):**

200 µl Triton X-100 (Sigma)

PBS *ad* 200 ml

4.: **Mowiol / DABCO:**

2,4 g Mowiol 40-88 (Sigma)

6 g Glycerin (Merck)

6 ml Aqua bidest.

12 ml Tris/HCl-Lösung 0,2 molar, pH 8,5 (Roth / Merck)

100 mg DABCO (1,4-Diazabicyclo(2.2.2.)octan; Sigma)

Diese Lösung diene als Eindeckmedium für Immunfluoreszenz-Präparate; sie wurde folgendermaßen hergestellt:

2,4 g Mowiol wurden in einem kleinen Erlenmeyerkolben mit 6 g Glycerin gemischt, 6 ml Aqua bidest. hinzugegeben, und ca. 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, bis eine homogene, zähe Masse entstand. Dann wurden 12 ml 0,2-molare Tris/HCl-Lösung pH 8,5 dazugegeben, auf 50°C erwärmt, und weitere 10 min. gerührt. Die so entstehende Lösung wurde in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, und 15 min. bei 5000 x g zentrifugiert (Eppendorf 5417R-Zentrifuge mit Eppendorf F 45-30-11 Rotor). Der Überstand wurde abgenommen, in 1 ml-Portionen aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -20°C aufbewahrt.

Direkt vor dem Gebrauch wurde 1 ml dieser Mowiol-Lösung mit 100 mg DABCO gemischt, und dann zum Eindecken der Deckglaspräparate verwendet.

b) Antikörper.

Anti-Asialoglykoproteinrezeptor (Anti-ASGPR) (Calbiochem, San Diego, USA)

Anti-Transferrinrezeptor (Anti-CD71) (HyTest, Turku, FIN)

Anti-Vimentin (Clone V9; Sigma)

Anti-Tubulin (Sigma)

Anti-HBs-Antigen (NCL-HBsAg-2; Novocastra, Newcastle upon Tyne, GB)

Anti-HBc-Antigen (Clone 13D3 u. C1-5; Chemicon International, Temecula, USA)

Anti-Maus, AlexaFluor 488- / AlexaFluor 594-konjugiert (Molecular Probes)

Anti-Kaninchen, AlexaFluor 488- / AlexaFluor 594-konjugiert (Molecular Probes)

c) Methodik.

1. Immunfluoreszenz. Die Herstellung von Deckglas-Präparaten für die Immunfluoreszenz war ein mehrstufiger Prozeß. Hier soll zunächst die Herstellung der dabei verwendeten Antikörperlösungen beschrieben werden, wobei diese Lösungen jeweils direkt vor dem Gebrauch frisch zubereitet wurden: Die Primärantikörper, die gegen die zellulären Antigene gerichtet waren, entstammten aus Mäusen oder Kaninchen. Zum Gebrauch wurden sie im Verhältnis 1:100 in PBS + 10% Ziegenserum (DakoCytomation, Glostrup, DK) verdünnt. Die Sekundärantikörper, gegen Maus- bzw. Kaninchenantikörper gerichtet, waren AlexaFluor 488- bzw. AlexaFluor 594-konjugiert; diese Fluorophore emittieren bei adäquater Anregung grünes bzw. rotes Licht. Auch die Sekundärantikörper wurden zum Gebrauch 1:100 in PBS + 10% Ziegenserum (DakoCytomation) verdünnt. Die zu untersuchenden Zellen, die auf Deckgläschen kultiviert wurden, und mit denen zum Teil kurz vorher ein Aufnahmeversuch durchgeführt wurde, wurden zunächst fixiert. Dazu wurden die betreffenden Deckgläschen senkrecht in einen speziellen Deckgläschen-Ständer gestellt, und für 30 min. bei Raumtemperatur in die 3%-ige Paraformaldehyd-Lösung getaucht. Anschließend wurden die Präparate für 30 min. bei Raumtemperatur in der Triton X-100-Lösung permeabilisiert, danach noch einmal in PBS gewaschen. In der Zwischenzeit wurde eine feuchte Kammer vorbereitet, wie sie in Kapitel 2.4 beschrieben ist, und von den Primärantikörper-Lösungen jeweils 40 µl pro Deckglaspräparat als großer Tropfen auf die Parafilm-Folie pipettiert. Auf diese Tropfen wurde je ein Deckgläschen gelegt, mit der Zellen tragenden Seite nach unten. Auf diese Weise wurden die Deckglaspräparate für 30 min. bei 37°C mit den Primärantikörpern inkubiert, anschließend wieder in den Deckgläschenständer überführt und fünfmal in PBS gewaschen. Danach wurden die Deckgläschen wieder in einer feuchten Kammer für 30 min. bei 37°C mit jeweils 40 µl Sekundärantikörper-Lösung inkubiert, und fünfmal in PBS gewaschen. Nun wurden auf einen Objektträger (Menzel, Braunschweig) vier Tropfen (jeweils ca. 10 µl) Mowiol/DABCO aufgebracht, und je ein Deckglaspräparat mit der Zellen tragenden Seite nach unten luftblasenfrei auf einen Tropfen dieses Eindeckmediums gelegt. Die derart mit bis zu vier Deckgläschen bestückten Objektträger wurden über Nacht zum Trocknen weggelegt, und zwar in völlige Dunkelheit, um die lichtempfindlichen Fluorophore zu schonen. Die fertigen Präparate konnten nun mikroskopiert werden. Hierfür wurde das konfokale Laser-scanning Mikroskop Leica TCS NT (Leica, Solms) mit einem Leica DM IRB/E-

Mikroskop und entsprechender Bildverarbeitungssoftware von Leica verwandt. Die Laser-Einheit verfügt über drei Ar/Kr-Laser mit 488 bzw. 568 bzw. 647 nm Lichtwellenlänge.

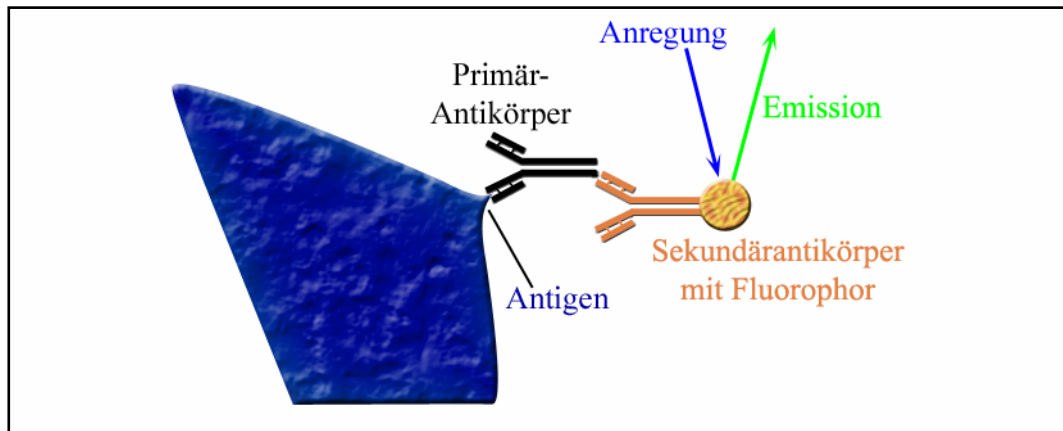


Abb. 2-5.1: Schematische Darstellung des Prinzips der Immunfluoreszenz. Während der Primärantikörper mit seinem Fab-Teil spezifisch an ein Antigen bindet, wird sein Fc-Teil vom Sekundärantikörper gebunden. An den Sekundärantikörper ist ein Fluorophor gekoppelt, welches bei Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (z.B. 488 nm [blau]) Licht mit einer größeren Wellenlänge (z.B. 519 nm [grün]) emittiert.

2. Immunzytochemie. Für die immunzytochemische Bearbeitung von Deckglaspräparaten wurde das Dako ChemMate Detection Kit APAAP, Mouse (DakoCytomation) verwendet. Dieses Immunzytochemie-System beruht auf einer Farbreaktion, bei der die Alkalische Phosphatase dieses Systems ein chromogenes Substrat in einen roten Farbstoff umsetzt. Es besteht aus mehreren Komponenten, einem Anti-Maus Sekundärantikörper, einem sogenannten Detektionsantikörper (Alkalische Phosphatase - Anti-Alkalische Phosphatase- Immunkomplex, APAAP-Komplex), sowie einem Entwicklersystem für den roten Farbstoff. Die zu untersuchenden Deckglas-Präparate wurden zunächst ebenso fixiert und permeabilisiert wie für die Immunfluoreszenz beschrieben. Der Primärantikörper wurde im Verhältnis 1:100 in einem speziellen Puffer (ChemMate Antibody Diluent; DakoCytomation) verdünnt; um das Immunzytochemie-Kit verwenden zu können, mußte der Primärantikörper in jedem Fall aus der Maus sein. Mit jeweils 40 µl dieser Primärantikörper-Lösung wurden die Deckgläschen in einer feuchten Kammer für 30 min. bei 37°C inkubiert, anschließend dreimal in PBS gewaschen. Dem folgte die Inkubation mit je 40 µl Sekundärantikörper-Lösung für 30 min. bei 37°C in einer feuchten Kammer, dreimaliges Waschen in PBS, dann die Inkubation mit je 40 µl der Detektionsantikörper-Lösung für 30 min. bei 37°C in einer feuchten Kammer, gefolgt von achtmaligem Waschen in PBS. Zur

anschließenden Inkubation mit dem Entwicklersystem (je 40 µl, 35 min. bei 37°C in einer feuchten Kammer) wurde diese Lösung aus den verschiedenen Komponenten, die in dem Immunzytochemie-Kit enthalten waren, jedesmal nach folgendem Schema frisch zubereitet:

Pro 100 µl Lösung: 89,0 µl AP-Substrat-Puffer

+ 3,5 µl Chromogen Red 1

+ 3,5 µl Chromogen Red 2

+ 3,5 µl Chromogen Red 3

+ 0,5 µl Levamisol

Nach der Inkubation mit diesem Entwicklersystem wurden die Deckglaspräparate wieder dreimal in PBS gewaschen. Anschließend wurden sie noch für 45 sec. mit jeweils 40 µl Hämalaun (freundliches Geschenk des Instituts für Pathologie am Klinikum der JLU Gießen) gegengefärbt, und nochmals in PBS gewaschen. Hämalaun färbt vor allem Zellkerne blau an. Zum Eindecken der Deckglaspräparate wurden je vier Tropfen eines speziellen Eindeckmediums (Glycergel; DakoCytomation) auf einen Objektträger (Menzel) aufgebracht, die Deckgläschen luftblasenfrei darauf gelegt, und für einige Stunden bei 4°C zum Trocknen gelegt. Die fertigen Präparate wurden mit einem Zeiss Axiophot-Mikroskop (Carl Zeiss) mikroskopiert, und mit einer angeschlossenen Sony 3CCD-Kamera (Sony) sowie der KS300 Bildanalyse-Software (Carl Zeiss) photodokumentiert.

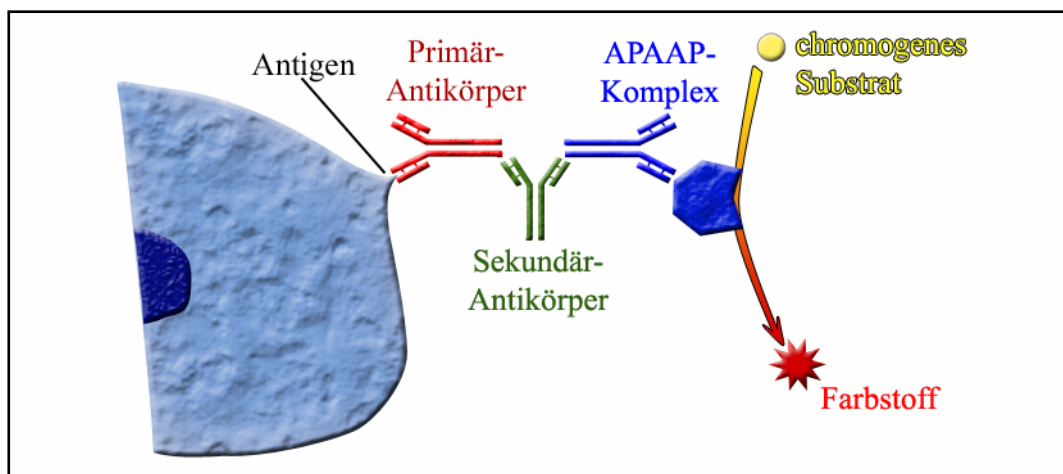


Abb. 2-5.2: Schematische Darstellung des Prinzips der immunzytochemischen Färbung mit dem verwendeten APAAP-System.

Der Primärantikörper bindet über seinen Fab-Teil spezifisch an ein Antigen. Sein Fc-Teil wird vom Sekundärantikörper gebunden, der an seiner anderen Bindungsstelle den sogenannten „Detektionsantikörper“ bindet. Dieser stellt einen Immunkomplex aus dem Enzym Alkalische Phosphatase und Antikörpern gegen dieses Enzym dar (Alkalische Phosphatase - Anti-Alkalische Phosphatase-Komplex, APAAP-Komplex). Bei Zugabe eines geeigneten chromogenen Substrates wird dieses von der Alkalischen Phosphatase zu einem roten Farbstoff umgesetzt.

3. E r g e b n i s s e

3.1. Methoden zur Isolation und Kryopräservation primärer Tupaia- und Rattenhepatozyten

Die Infektion von Hepatozyten mit dem humanen Hepatitis B-Virus ist *in vitro* bislang nur unter bestimmten Bedingungen möglich. Primäre humane Hepatozyten sind nur sehr eingeschränkt aus Operationspräparaten erhältlich, und zeigen meist nur eine schwache Infektion unter experimentellen Bedingungen.

Verfügbare etablierte humane Hepatomzelllinien wie HepG2 oder HuH7 sind nicht suszeptibel für eine Infektion, obwohl sie nach Transfektion mit HBV-DNA Viren produzieren.

Ebenso nicht suszeptibel für HBV haben sich primäre Hepatozyten verschiedener Kleintiere wie Ratten gezeigt, wohl aber die des in Südostasien beheimateten Spitzhörnchens *Tupaia belangeri* (SU 1987, WALTER *et al.* 1996), welches eine sehr entfernte Verwandtschaft zu Primaten hat (siehe Kapitel 1.3).

Um die Infektion primärer Tupaiahepatozyten mit HBV *in vitro* zu charakterisieren und dieses Infektionssystem weiter etablieren zu können, war es notwendig, diese Zellen möglichst rein zu isolieren und über einen bestimmten Zeitraum zu kultivieren.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente, bei denen die mikroskopische Untersuchung von Tupaiahepatozyten im Vordergrund stand, sollten die Zellkulturen so angelegt werden, daß sie möglichst aus einer einschichtigen Lage („Monolayer“) von Einzelzellen oder kleineren Zellgruppen bestanden, und möglichst wenige nichtparenchymatische Zellen enthielten. Um dies zu erreichen, und gleichzeitig eine hohe Qualität der relativ schwer verfügbaren Zellen zu gewährleisten, mußten zunächst die bislang etablierten Methoden zur Isolation und Kultivierung primärer Rattenhepatozyten den Eigenschaften und Bedürfnissen von Tupaiazellen angepaßt werden.

Außerdem sollten die Kulturbedingungen so eingestellt werden, daß ein bestimmter Differenzierungszustand der Zellen möglichst lange aufrecht erhalten werden konnte, da hiervon multiple Zellfunktionen, unter anderem auch die Expression von Oberflächenrezeptoren, beeinflußt werden.

3.1.1 Isolation

Eine weit verbreitete Methode zur Isolation primärer Hepatozyten wurde 1976 von SEGLEN beschrieben. Dabei wird die Leber des Tieres von der Vena portae her in einer Zwei-Schritt-Technik zunächst mit einem calcium- und enzymfreien Medium perfundiert, anschließend mit einer Lösung, die sowohl Calcium als auch Collagenase enthält. Dadurch können die Zellen aus dem Gewebeverband lebend herausgelöst und anschließend kultiviert werden.

Die Gewinnung primärer Tupaiahepatozyten nach einer modifizierten Zwei-Schritt-Collagenase-Perfusionstechnik, wie sie bei BERRY *et al.* (1991) für Rattenhepatozyten beschrieben ist, erbrachte zunächst vor allem quantitativ unbefriedigende Ergebnisse. Zwar waren die erhaltenen Zellen in gutem Zustand, jedoch verblieb ein sehr großer Anteil ungenutzt in Parenchymverband der Leber, so daß pro getötetem Tier nur verhältnismäßig wenige Zellen für Versuche gewonnen werden konnten.

Diese Situation stellte sich bei Ratten ebenso dar; da die Körpergröße dieser Tiere mit der von Tupaias vergleichbar ist, und bei ihnen die Hepatozytenisolation sehr gut etabliert und mannigfaltig beschrieben ist (u.a. BERRY *et al.* 1991, GUGUEN-GUILLOUZO *et al.* 1982), wurden Modifikationen der Perfusionsbedingungen zunächst an diesen leichter verfügbaren Tieren erprobt.

In enger gemeinschaftlicher Zusammenarbeit mit Frau M. ALIAKBARI und Tierärztin Frau E. KNOOP wurden die Auswirkungen von Änderungen des Perfusionsdruckes, der Perfusionszeiten und der Perfusionslösungen untersucht.

a) Perfusionsdruck. Der Druck, der während der Perfusion in den intrahepatischen Gefäßen und Sinusoiden aufgebaut wird, ist einerseits abhängig vom Widerstand des intra- und posthepatischen Gefäßsystems, andererseits von der Volumenflußrate, das heißt dem eingebrachten Flüssigkeitsvolumen pro Zeiteinheit. Physiologische Werte bei der Ratte sind ein portalvenöser Druck von ca. 9,5 mmHg und ein Blutfluß von ca. 7 ml/min/100g Körpergewicht (SIKULER *et al.* 1985); Angaben zu den Verhältnissen bei Tupaias waren nicht verfügbar, aber es ist anzunehmen, daß sie ähnlich sind.

Da die in Gießen gehaltenen Tupaias durchschnittlich ca. 200 g wiegen, errechnete sich daraus ein portalvenöser Blutfluß von ca. 14 ml/min.

Aus praktischen Gründen wurde bei den durchgeführten Zellisolationen der Druck nicht gemessen, sondern nur unterschiedliche Volumenflußraten vorgegeben.

Bei einem anfänglichen Volumenfluß von 25 ml/min und der Perfusion des noch in der Bauchhöhle des Tieres befindlichen Organs durch eine Einflusskanüle in der Vena portae, und zwei großlumige Ausflusskanülen (20 und 18G) im supra- bzw. infradiaphragmalen Abschnitt der Vena cava inferior, war makroskopisch und palpatorisch eine deutliche Schwellung und Anspannung der Leber als Zeichen eines hohen intrahepatischen Druckes zu beobachten.

Durch die sukzessive Reduktion der Flußrate auf 8-10 ml/min und der Exkorporation des perfundierten Organs zur Gewährleistung eines unbehinderten Flüssigkeitsabflusses mit minimalem Widerstand konnte die Gewebespannung deutlich reduziert werden (Abb. 3-1.1). Die Folge war eine deutliche Steigerung der Zellausbeute um den Faktor 2-3, sowie eine Verbesserung der Viabilität der Zellen um etwa 10% im Trypanblau-Ausschlußverfahren.

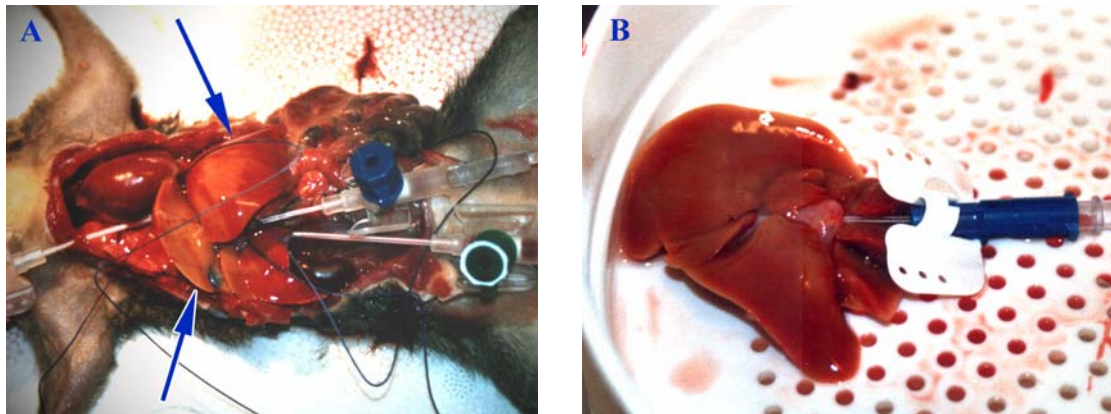


Abb. 3-1.1: Reduktion des Perfusionswiderstandes durch Verlagerung der Leber aus der Bauchhöhle (A) auf einen Lochtrichter (B) und damit Elimination des widerstandserzeugenden posthepatischen Gefäßsystems. Gleichzeitig Verringerung der Volumenflußrate. Deutlich höhere Spannung der Leberkapsel auf Bild A (Pfeile).

b) Perfusionsdauer. Die Leber wurde so lange perfundiert, bis die bindegewebige Leberkapsel auf leichten Druck oder spontan einzureißen begann und das Organ deutlich aufweichte.

Unter den anfänglichen Perfusionsdrücken stellte sich dieser Zustand nach 15-20 min. Perfusion mit PBS (calciumfreie Lösung) und 25 min. mit Collagenase ein. Mit der Reduktion des Druckes mußte die Perfusionsdauer auf 40 min. mit calciumfreier Lösung und 30 min. mit Collagenase erhöht werden.

Die Kapsel riß dabei nicht mehr spontan ein, wie es bei höherem Druck der Fall war, sondern erst auf leichten Druck mit der Pinzette.

c) *Perfusionslösungen.*

In der ersten Hälfte der Perfusionszeit mit calciumfreier Lösung wurde PBS mit 12,5 mmol/l EGTA verwandt, um durch Komplexbildung der Calciumionen den Calciumentzug aus dem Organ zu verbessern. In der zweiten Hälfte der ersten Perfusionsphase wurde PBS ohne EGTA eingesetzt, um das eingebrachte EGTA wieder herauszuwaschen, damit die Funktion der Ca^{2+} -abhängigen Collagenase in der nachfolgenden Perfusionsphase nicht beeinträchtigt wird.

BERRY *et al.* (1991) beschreiben sowohl den Einsatz einer eiskalten, als auch einer raumtemperierten calciumfreien Lösung im Rahmen der Hepatozytenisolation, mit jeweils unterschiedlichen Vor- und Nachteilen für die isolierten Zellen (siehe Diskussion). Bei den hier durchgeführten Perfusionen wurde zunächst 4-6°C kalte PBS-Lösung eingesetzt, später das Schema aber auf eine oxygenierte und raumtemperierte Lösung (22-24°C) umgestellt, was in einer höheren Viabilität der Zellen resultierte (ca. +10%).

Die handelsüblichen Collagenasen bestehen aus einer Mischung verschiedener Enzyme, in der Regel Collagenase aus *Clostridium histolyticum*, Clostripain, Trypsinähnliche Protease, Neutrale Protease und weiteren, sind also sehr heterogener Natur und aufgrund verschieden starker relativer Enzymaktivitäten von unterschiedlicher Wirksamkeit. Für die Anwendbarkeit bei der Isolation von Tupaiahepatozyten wurden vier verschiedene Collagenasen unterschiedlicher Hersteller getestet:

Gute Resultate ergab die „Collagenase P“ der Firma ROCHE; „Collagenase Hep plus“ (Fa. SERVA) und Collagenase Typ II der Firma SIGMA erwiesen sich hier jedoch hinsichtlich Qualität (ca. 90% Viabilität) und Quantität der gewonnenen Hepatozyten als noch besser geeignet.

Die von der Fa. GIBCO angebotene, Collagenase und Dispase enthaltende Perfusionslösung „Liver digest medium“ mit nicht genau bekannter Zusammensetzung hingegen führte kaum zu einer Aufweichung der Leber und einer deutlich geringeren Zellausbeute, bei einer Viabilität von ca. 80%.

Durch die kombinierte Anwendung all dieser modifizierten Parameter konnte die Viabilität der isolierten Zellen von ca. 65% auf über 90% im Trypanblau-Ausschlußverfahren gesteigert werden. Quantitativ war eine Erhöhung der Zellausbeute um etwa den Faktor 3 möglich. So konnten bei einem durchschnittlichen Lebergewicht von ca. 6 g (Minimum: 3,65 g, Maximum: 10,18 g) durchschnittlich etwa 10×10^6 Zellen / g Leber gewonnen werden (Minimum: $6,16 \times 10^6$, Maximum: $14,18 \times 10^6$).

Generell war die Isolation von Tupaiahepatozyten immer ergiebiger als die von Rattenhepatozyten.

Als wohl bedeutsamster Faktor erwies sich die Modifikation der Volumenflußrate, mit der die Leber perfundiert wurde, in Kombination mit der daran angepaßten Perfusionsdauer.

Einen deutlich geringeren Einfluß auf Qualität und Quantität der isolierten Zellen hatten auch die Eigenschaften der Perfusionslösungen, und zwar sowohl die Temperatur der calciumfreien Lösung, als auch die verwendete Collagenase-Präparation.

Eine Übersicht gibt Tabelle 3.1:

Tab. 3.1: Änderung von Viabilität und Zellausbeute bei der Isolation primärer Tupaia-hepatozyten durch Modifikation von Volumenflußrate (**b**) und Eigenschaften der Perfusionslösungen (**c**).

Perfusionsschema	Viabilität	Zellausbeute (Zellen / g Leber)
a) Perfusion mit 25 ml/min, 20 min mit kaltem (4-6°C) PBS, 25 min mit „Collagenase P“ (ROCHE)	~65 %	~ 3,5 x 10 ⁶
b) Perfusion mit 8 ml/min, 40 min mit kaltem (4-6°C) PBS, 30 min mit „Collagenase P“ (ROCHE)	~75 %	~ 8,5 x 10 ⁶
c) Verwendung von oxygeniertem, warmem (22-24°C) PBS und PBS + 12,5 mmol/l EGTA , sonst wie b)	~85 %	~ 8,5 x 10 ⁶
+ Verwendung von „ Liver Digest Medium “ (GIBCO)	~80 %	~ 6,5 x 10 ⁶
+ Verwendung von „ Collagenase Hep plus “ (SERVA) oder „ Collagenase Typ II “ (SIGMA)	~90-95 %	~ 10 x 10 ⁶

Das in Kapitel 2.2.1 beschriebene Vorgehen zur Isolation primärer Hepatozyten berücksichtigt die hier beschriebenen Verbesserungen der Methode.

3.1.2 Kryopräservation

Für eine bessere und kurzfristigere Versuchsplanung ist es wünschenswert, bei Bedarf Zellen schnell und in variablen Größenordnungen zur Verfügung zu haben, ohne sie unmittelbar vor Versuchsbeginn aufwendig isolieren zu müssen. Eine Möglichkeit hierzu bietet die Kryopräservation von Zellen, welche bei Tumorzelllinien gut etabliert und weit verbreitet ist. Auch bei primären Hepatozyten wäre die Möglichkeit der Kryopräservation isolierter Zellen in kleinen Portionen sinnvoll, um verschiedene Versuche zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit den gleichen Zellen durchführen und optimal vergleichen zu können. Die Problematik bei diesem Vorgehen besteht darin, daß es sowohl beim Einfrieren durch intrazelluläre Eiskristallbildung (HARRIS *et al.* 1991), als auch beim Auftauen durch Apoptose und Nekrose (BAUST *et al.* 2000) zu Zellverlusten kommt.

Zuerst wurde der Versuch unternommen, durch Modifikation eines Protokolls zum Einfrieren und Auftauen von Zelllinien, wie es bei LINDL u. BAUER (1987) beschrieben ist, primäre Tupaiahepatozyten einzufrieren und aufzutauen. Dabei wurden die frisch isolierten Zellen nach einem Ein-Schritt-Protokoll unter Verwendung eines Gefriermediums aus 54% DMEM, 26% FKS und 20% DMSO eingefroren, das Auftauen fand auch nach einem Ein-Schritt-Protokoll mit sofortiger Reduktion der DMSO-Konzentration auf 2% und Zentrifugation für 6 min. bei 40 x g und 4°C statt. Dieses Vorgehen resultierte im Tod aller Zellen noch während dieser Prozedur.

In einem neuen Versuchsansatz wurden die frisch isolierten Hepatozyten in einer Ein-Schritt-Technik unter Verwendung eines eiskalten Gefriermediums aus 70% modifizierter „University of Wisconsin solution“ („UW-Lösung“), 20% fetalem Kälberserum und 10% DMSO sofort für einen Tag bei -70°C eingefroren, und anschließend bei -165°C gelagert. Die UW-Lösung wurde dahingehend modifiziert, daß sie mit 5% Polyethylenglykol (PEG) versetzt wurde; es wurde beschrieben, daß durch PEG die Peroxidierung von Lipiden in der Zellmembran kältepräservierter Hepatozyten reduziert werden kann (MACK *et al.* 1991, BEN ABDENNEBI *et al.* 2002).

Das Auftauen der Zellen fand unter schrittweiser Reduktion der DMSO-Konzentration in 5-minütigen Intervallen statt, anschließender Zentrifugation für 6 min. bei 4°C und 40 x g und Resuspendierung des Zellpellets in 37°C warmen „Anheftungsmedium“ (Näheres s. „Material und Methoden“).

Eine ähnliche Methode zur Kryopräservierung von primären Hepatozyten wurde von DANDRI *et al.* (2001) beschrieben, zunächst für die Anwendung an Hepatozyten des nordamerikanischen Waldmurmeltiers (*Marmota monax*). Dabei überlebte ein Großteil der Zellen einen Einfrier-Auftau-Zyklus. Durch einige Modifikationen wurde hier dieses Protokoll für die Anwendung an primären Tupaiahepatozyten optimiert.

Nach Beendigung des praktischen Teils dieser Arbeit berichteten auch DANDRI *et al.* (2005) über die Anwendung ihrer Kryopräservationsmethode an primären Tupaiahepatozyten.

Nach der Trypanblau-Ausschlußmethode lag die Viabilität der frisch isolierten Hepatozyten im Mittel bei etwa 90%, die Anheftungsrate bei ca. 75 bis 80%; nach einem Einfrier-Auftau-Zyklus betrug die Viabilität 70 bis 80% (Abb. 3-1.2), ca. 60% der Zellen hefteten sich an die Collagenmatrix der Zellkulturschale an.

Wurde im Gefriermedium die UW-Lösung durch DMEM substituiert, so sanken Viabilität und Anheftungsrate der Hepatozyten um 10-15% (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Viabilität und Anheftungsrate von primären Tupaiahepatozyten direkt nach Isolation (**a**) und nach einem Einfrier-Auftau-Zyklus unter Verwendung von DMEM bzw. UW-Lösung als Bestandteil des Gefriermediums (**b** und **c**).

	Viabilität	Anheftungsrate
a) Frisch isolierte Zellen	90 - 95 %	75 - 80 %
b) Einfrieren / Auftauen mit DMEM	60 - 65 %	50 - 60 %
c) Einfrieren / Auftauen mit UW-Lösung	70 - 80 %	60 - 65 %

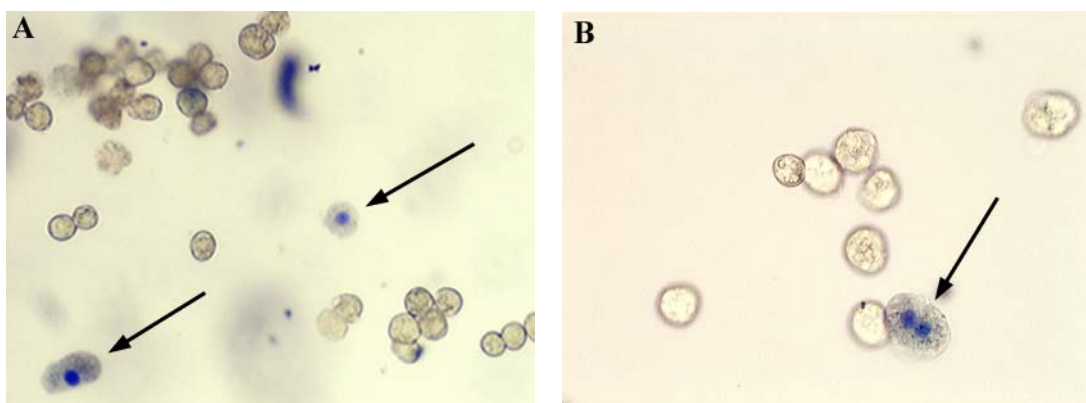


Abb. 3-1.2: Primäre Tupaiahepatozyten direkt nach Auftauen; Trypanblaufärbung zur Identifikation toter Zellen (Pfeile). Hellfeldmikroskopie, Mikroskopvergrößerung 100x (**A**) bzw. 200x (**B**).

Diejenigen Hepatozyten, die einem Einfrier-Auftau-Zyklus ausgesetzt waren, wiesen am ersten Tag der Kultivierung gegenüber frisch isolierten Zellen keine erkennbaren morphologische Unterschiede auf (Abb. 3-1.3). Sie ließen sich auch über einen genauso langen Zeitraum kultivieren.

Das gleiche Protokoll konnte mit vergleichbaren Ergebnissen auf primäre Rattenhepatozyten übertragen werden.

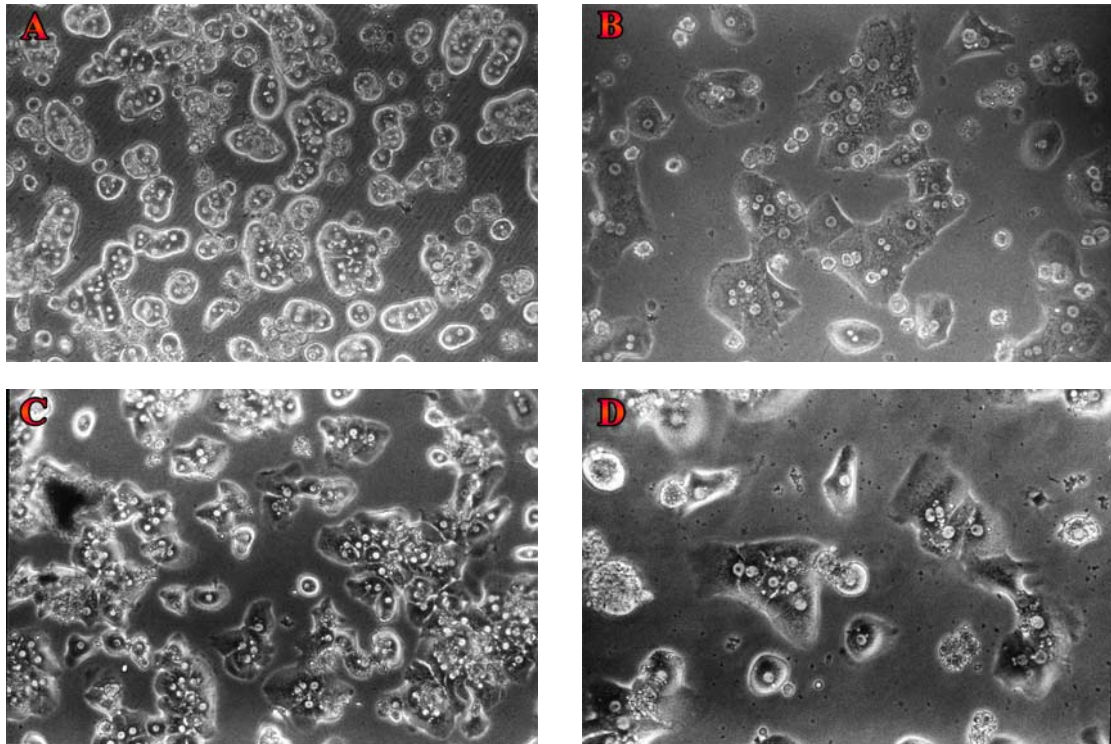


Abb. 3-1.3: Primäre Tupaiahepatozyten, einen Tag nach Kultivierung.

A, B: Kryopräservierte Zellen. C, D: Frisch isolierte Zellen.

Es sind lichtmikroskopisch praktisch keine morphologischen Unterschiede erkennbar. Phasenkontrastmikroskopie, Mikroskopvergrößerung 200x (A, C) bzw. 320x (C, D).

3.2. Charakterisierung von Proteinexpression und funktioneller Differenzierung primärer Tupaiahepatozyten

Primäre Hepatozyten zeigen unter Zellkulturbedingungen sehr schnell Zeichen der Dedifferenzierung. Dies zeigt sich sowohl morphologisch, als auch durch den Verlust leberzellspezifischer Funktionen, sowie einem veränderten Expressionsmuster von Zytokeratinen und Intermediärfilamenten. Ein hoher Differenzierungszustand der Zellen kann durch die Zugabe von DMSO und Dexamethason zum Zellkulturmedium, und Kultivierung auf einer Collagenmatrix aufrechterhalten werden (MARCEAU u. LORANGER 1995, ARTERBURN *et al.* 1995). Die Expression bestimmter Zytoskelettkomponenten steht dabei in einem charakteristischen Verhältnis zur Produktion leberspezifischer Proteine und damit leberspezifischer Funktionen.

Um genauere Aufschlüsse über den Differenzierungszustand der unter definierten Bedingungen kultivierten Tupaiahepatozyten zu erhalten, wurden sie auf die Expression verschiedener Zytoskelettfilamente und Oberflächenrezeptoren untersucht.

Die Zellen wurden auf einer Collagenmatrix (Typ I Collagen) und in einem DMSO- und Dexamethason-haltigen Medium („Tupaiaedium“) kultiviert (siehe „Material und Methoden“).

3.2.1 Expression von Tubulin und Vimentin

a) Tubulin. Tubulin ist ein dimeres, ca. 50kD großes Protein, welches als Hauptbestandteil von Mikrotubuli und Zentriolen in allen kernhaltigen Zellen vorkommt, und phylogenetisch hoch konserviert ist, das heißt kaum Unterschiede zwischen auch weit entfernten Arten zeigt (JUNQUEIRA *et al.* 1996). In isolierten (Ratten-) Hepatozyten liegen ca. 15% des vorhandenen Tubulins als Strukturbestandteil von Mikrotubuli vor, der Rest als lösliches Protein, welches ca. 1% der löslichen Zellproteine ausmacht (REAVEN *et al.* 1977).

Tubulin in Form von Mikrotubuli konnte in allen kultivierten Tupaiahepatozyten in der konfokalen Laser-scanning Mikroskopie mit einem Antikörper gegen acetyliertes α -Tubulin nachgewiesen werden (Abb. 3-2.1).

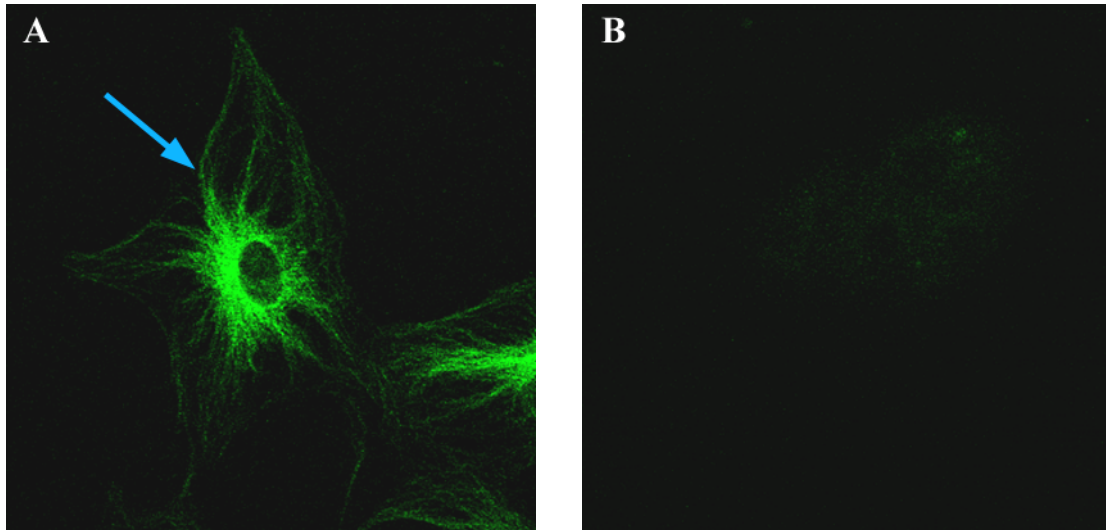


Abb. 3-2.1: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Tubulin (grün) in primären Tupaihepatozyten. **A:** Bündel von Mikrotubuli sind gut erkennbar (Pfeil). **B:** Negativkontrolle.
Konfokale Laser-scanning Mikroskopie, Mikroskopvergrößerung 630x.

b) Vimentin. Das Intermediärfilament Vimentin wird vornehmlich in mesenchymalen, embryonalen und undifferenzierten Zellen exprimiert, und spielt eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Zellstruktur (JUNQUEIRA *et al.* 1996). Die Expression von Vimentin in kultivierten Hepatozyten ist in starkem Maße abhängig vom Differenzierungszustand der Zellen. Vereinfacht ausgedrückt, nimmt die Vimentinexpression mit zunehmender Differenzierung ab. Ausführlichere Informationen hierzu sind dem Diskussionsteil (Kap. 4.2) zu entnehmen.

Das Vorhandensein von Vimentinfilamenten konnte in Tupaihepatozyten, die drei Tage lang auf einer Collagenmatrix und in „Tupaia-medium“ kultiviert wurden, prinzipiell nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, daß nicht alle kultivierten Hepatozyten Vimentin exprimierten, sondern bevorzugt solche, die entweder solitär lagen, oder aber in der Peripherie eines zusammenhängenden Zellverbandes.

Zwischen diesen beiden Vimentin-positiven Hepatozytenpopulationen war weiterhin das intrazelluläre Verteilungsmuster unterschiedlich: Bei den einzeln liegenden Zellen waren die Filamente in mehreren dicken Bündeln organisiert, die das Zytoplasma durchzogen, und sich perinukleär verdichteten. Lagen die Zellen in einem Zellverband, so war das Vimentin fast homogen über das gesamte Zytoplasma verteilt, mit einer verstärkten Ansammlung unter der zur Peripherie hin gelegenen Zytoplasmamembran (Abb.3-2.2).

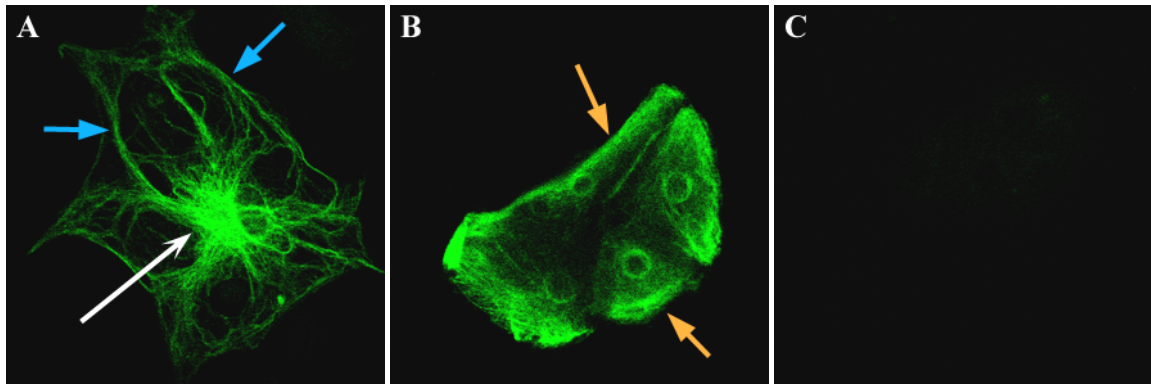


Abb. 3-2.2: Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Vimentin (grün) in primären Tupaiahepatozyten.

A: Bei solitär liegenden Zellen sind die Filamente in dicken Strängen organisiert (blaue Pfeile), und verdichten sich perinukleär (weißer Pfeil).

B: In Zellverbänden fallen Verdichtungszone an den Außenrändern (orange Pfeile) bei sonst relativ homogener Verteilung der Filamente im Zytoplasma auf.

C: Negativkontrolle.

Konfokale Laser-scanning Mikroskopie, Mikroskopvergrößerung 630x.

3.2.2 Funktioneller Nachweis hepatozytärer Oberflächenrezeptoren

Um die Funktionalität der kultivierten Tupaiahepatozyten zu charakterisieren, wurde die Funktion von Oberflächenrezeptoren, die normalerweise nur von differenzierten Hepatozyten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* exprimiert werden, untersucht.

Zu den am besten erforschten hepatozytären Rezeptoren gehören der Transferrin- und der Asialoglykoproteinrezeptor (ASGPR).

a) Untersuchung des Asialoglykoproteinrezeptors. Der Asialoglykoproteinrezeptor (ASGPR) kommt ausschließlich auf Hepatozyten vor, wo er bevorzugt an der sinusoidalen (basolateralen) Zytoplasmamembran lokalisiert ist. Er vermittelt die Aufnahme von Glykoproteinen, bei denen der endständige Sialinsäurerest der Glykankette abgespalten wurde (Asialoglykoproteine), durch Bindung von endständigen D-Galaktose- oder D-N-Acetylgalaktosamin-Resten. Desialylierte Glykoproteine werden also unabhängig von der Beschaffenheit ihres Proteinanteils, und damit weitgehend unabhängig von ihrer Herkunftsspezies aufgenommen. Der Rezeptor kommt bei praktisch allen Säugetieren vor, und ist phylogenetisch hoch konserviert (SPIESS 1990). Er wird auch von der Hepatomzelllinie HepG2 exprimiert (BISCHOFF u. LODISH 1987).

Zur Untersuchung der Funktionsfähigkeit des ASGPR bei isolierten Tupaiahepatozyten wurden die auf collagenisierten Deckgläschen kultivierten Zellen für 90 min. bei 37°C mit einem Nährmedium (DMEM) inkubiert, das pro Ansatz 500 ng lactosyliertes, Fluoresceinisothiocyanat- (FITC-) markiertes Humanalbumin enthielt (durch die Laktosylierung erhält das Albumin endständige Galaktosylreste), danach gründlich gewaschen und fixiert. Zum Vergleich dienten primäre Rattenhepatozyten und HepG2-Zellen. Die Zellen wurden zu keinem Zeitpunkt auf irgendeine Art und Weise permeabilisiert.

In einem direkten Fluoreszenztest mittels konfokaler Laser-scanning Mikroskopie konnte das markierte lactosylierte Albumin sowohl in den primären Zellen, als auch in HepG2-Zellen nachgewiesen werden. Entweder stellte es sich in Form von größeren, zytoplasmatischen Foci dar, oder aber andererseits feingranulär über die Zelle verteilt. (Abb. 3-2.3). In den Präparaten mit primären Zellen war ein deutliches Fluoreszenzsignal in ca. 60-65% der Zellen nachweisbar.

Stellte man bei Präparaten, bei denen Tupaiahepatozyten mit lactosyliertem, FITC-markierten Albumin inkubiert wurden, nach der Inkubation in einem indirekten Immunfluoreszenztest Vimentin dar, so stellten sich folgende Gegebenheiten dar:

Bei denjenigen Zellen, die eine starke Vimentinexpression zeigten, konnte keine Aufnahme von markiertem lactosylierten Albumin nachgewiesen werden. Die Darstellung einer solchen Aufnahme gelang nur in solchen Zellen, die sehr wenig Vimentin exprimierten (Abb. 3-2.4).

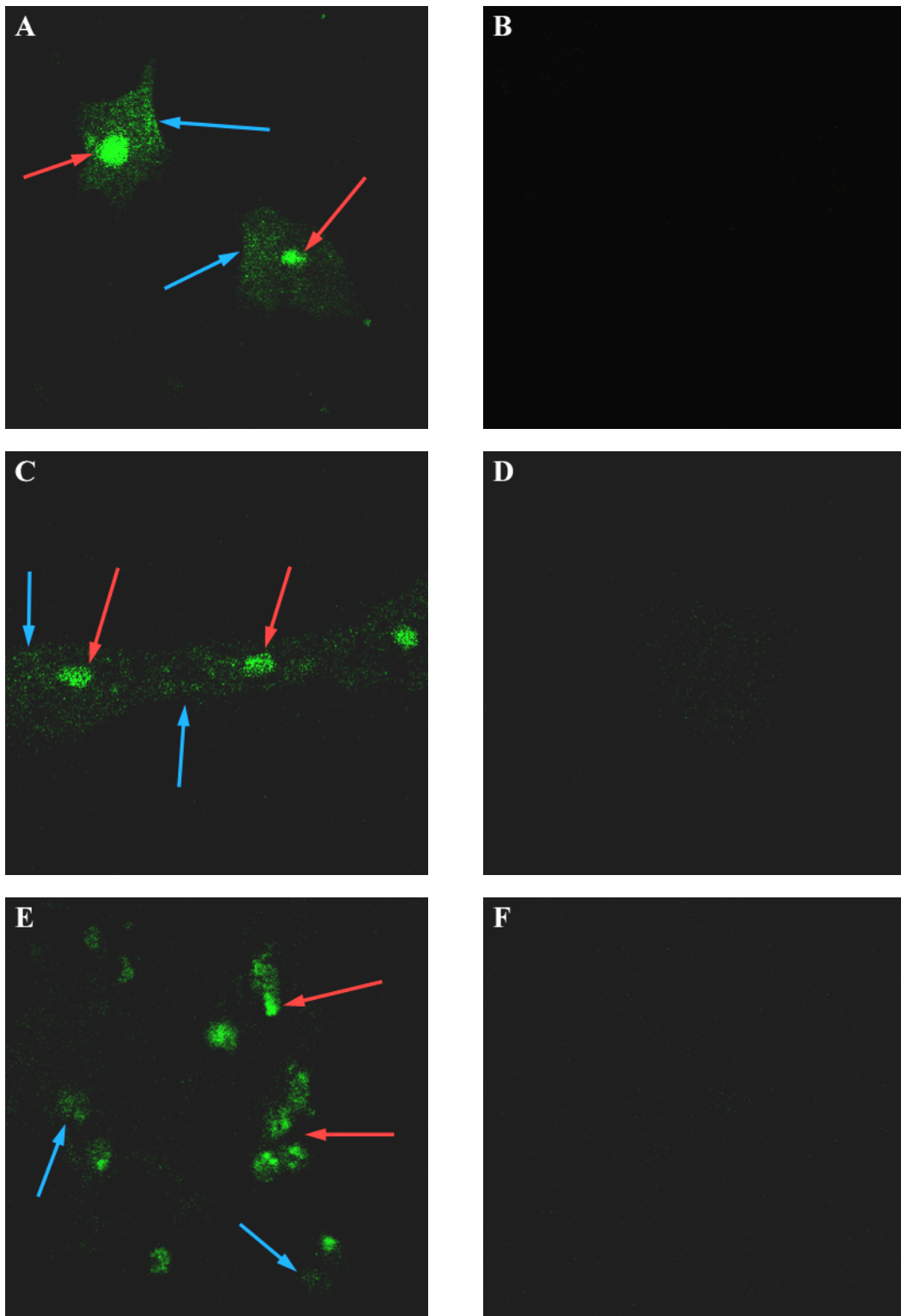


Abb. 3-2.3: Aufnahme von lactosyliertem und FITC-markierten Humanalbumin (grün); Nachweis größerer Ansammlungen (rote Pfeile) neben einer feingranulären Verteilung (blaue Pfeile) in primären Tupaiahepatozyten (A), primären Rattenhepatozyten (C) und HepG2-Zellen (E). B, D, F: Negativkontrollen. Konfokale Laser-scanning Mikroskopie, Mikroskopvergrößerung 630x.

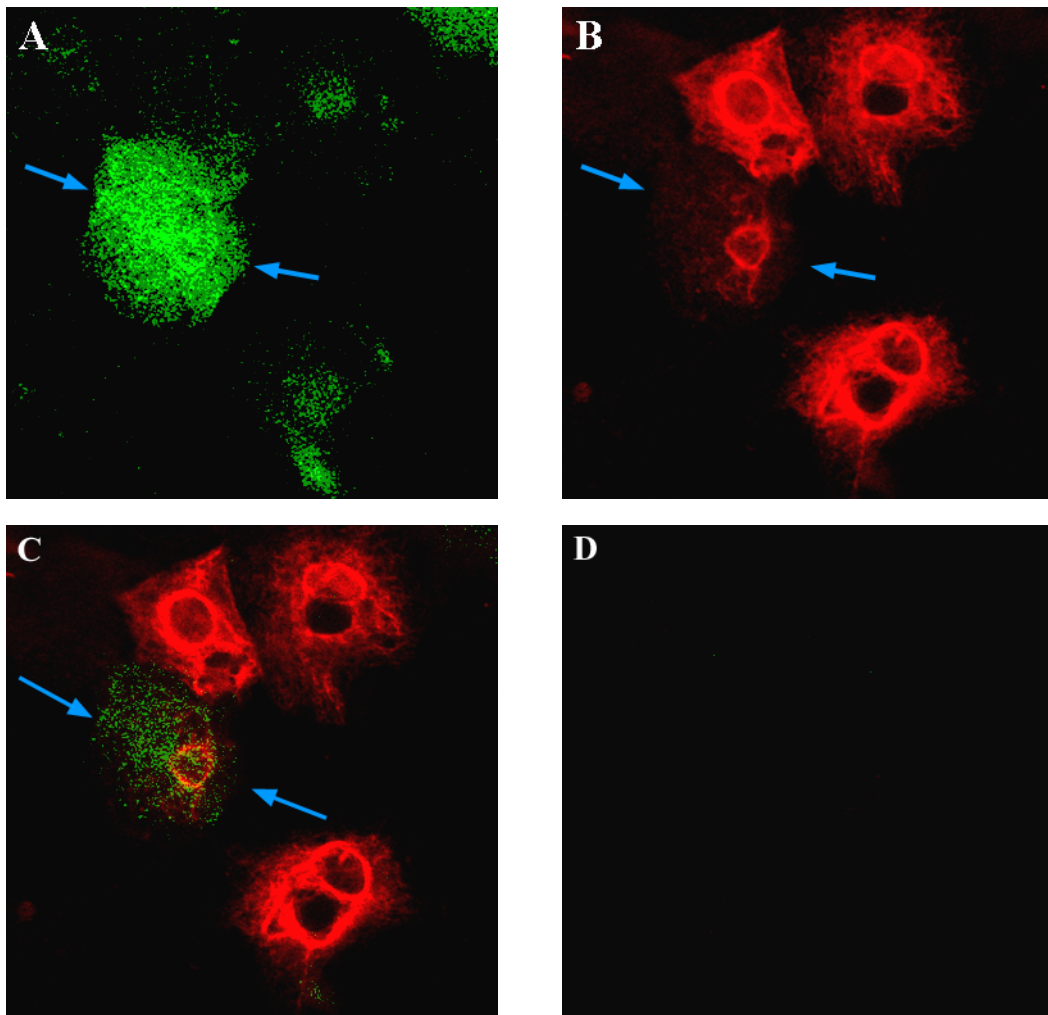


Abb. 3-2.4: Simultane Darstellung von laktosyliertem, FITC-markiertem Humanalbumin (grün) und Vimentin (rot) in primären Tupaiahepatozyten. Das laktosylierte FITC-Albumin ist, feingranulär, in relevantem Maße nur bei einer Zelle nachweisbar, die wenig Vimentin exprimiert (Pfeile). Bei den Zellen mit starker Vimentinexpression ist praktisch kein FITC-Signal erkennbar.
A: Grüner Kanal (nur lakt. FITC-Albumin); **B:** Roter Kanal (nur Vimentin)
C: Überlagerungsbild (lakt. FITC-Albumin + Vimentin) **D:** Negativkontrolle.
 Konfokale Laser-scanning Mikroskopie, Mikroskopvergrößerung 630x.

In den primären Hepatozytenkulturen fanden sich teilweise in kleinen Mengen (< 2%) auch nichtparenchymatische Leberzellen, die sich an Hand ihrer Größe und Morphologie gut von Hepatozyten unterscheiden ließen. In ihnen ließ sich Vimentin nachweisen, aber nie eine Bindung oder Aufnahme von laktosyliertem, FITC-markierten Humanalbumin (Abb. 3-2.5).

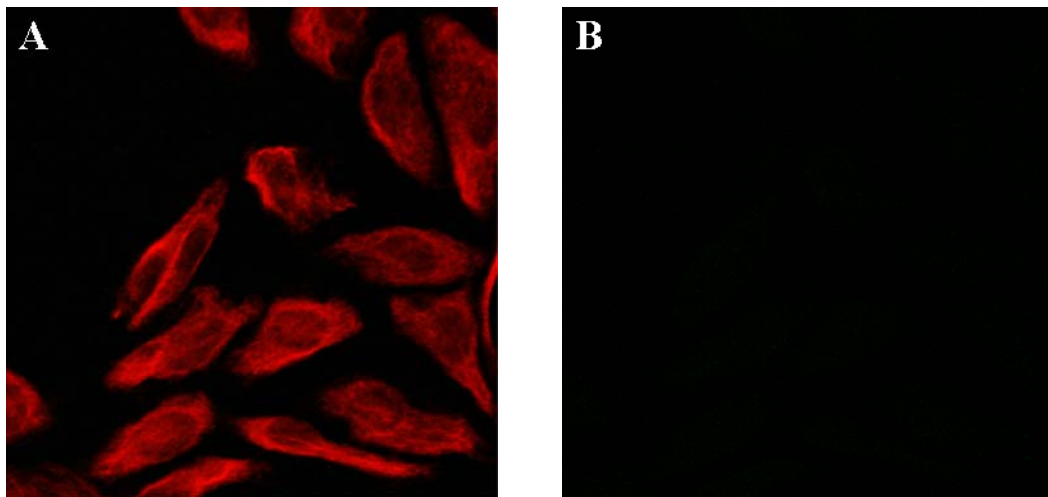


Abb. 3-2.5: Simultane Darstellung von Vimentin (rot) und lactosyliertem FITC-Humanalbumin (grün) in nichtparenchymatischen Tupaialeberzellen; ein Signal des grün markierten Albumins ist nicht nachweisbar.

A: Roter Kanal (nur Vimentin); **B:** Grüner Kanal (nur lact. FITC-Albumin).
Konfokale Laser-scanning Mikroskopie, Mikroskopvergrößerung 630x.

b) Untersuchung des Transferrinrezeptors. Der Transferrinrezeptor (CD 71) vermittelt die Aufnahme von an (Apo-)Transferrin gebundenen Eisenionen in Zellen; er wird vornehmlich auf Hepatozyten, KUPFFER-Zellen, pankreatischen β -Zellen und Zellen von Hoden, Hypophyse und Epidermis exprimiert (GATTER *et al.* 1983). Sein Vorkommen auf primären Rattenhepatozyten und auf HepG2-Zellen wurde ebenfalls beschrieben (THORSTENSEN u. ROMSLO 1984, HIRSH *et al.* 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Tupaiahepatozyten, die auf collagenisierten Deckgläschen in „Tupaiaedium“ kultiviert wurden, 90 min. lang bei 37°C mit einem Nährmedium (DMEM) inkubiert, dem pro Ansatz 500 ng humanes, AlexaFluor 594-markiertes Transferrin zugegeben wurden. Nach ausgiebigem Waschen wurden die Präparate fixiert und mittels konfokaler Laser-scannig Mikroskopie untersucht. Zum Vergleich dienten HepG2-Zellen.

Bei HepG2-Zellen konnte das markierte Transferrin in Form von kleinen zytoplasmatischen Herden nachgewiesen werden; in primären Tupaiahepatozyten stellte es sich jedoch nicht dar (Abb. 3-2.6).

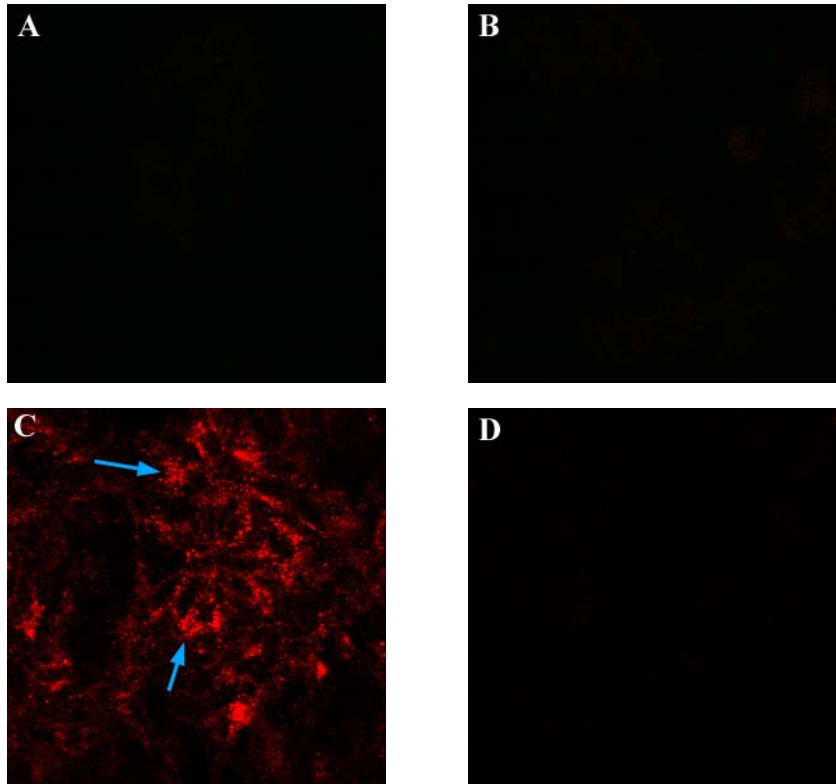


Abb. 3-2.6: Aufnahme von humanem Transferrin-Ax594 (rot).
A: Bei primären Tupaiahepatozyten ist keine Aufnahme nachweisbar.
C: In HepG2-Zellen stellt sich das aufgenommene Transferrin in kleinen, runden, zytoplasmatischen Foci dar (Pfeile).
B, D: Negativkontrollen von Tupaia- bzw. HepG2-Zellen.
 Konfokale Laser-scanning Mikroskopie, Mikroskopvergrößerung 630x.

c) Nachweis hepatozellulärer Oberflächenrezeptor-Strukturen.

Mittels eines indirekten Immunfluoreszenztests mit Primärantikörpern gegen den humanen Transferrin- bzw. Asialoglykoproteinrezeptor wurde versucht, diese Rezeptoren auf Tupaiahepatozyten zu markieren, und mit Hilfe eines fluorophormarkierten Sekundärantikörpers darzustellen. In beiden Fällen blieb der Nachweis jedoch negativ.

3.2.3 Immunzytochemische Darstellung von Zellstrukturen

Primäre Tupaiahepatozyten zeigten in der Fluoreszenzmikroskopie eine starke Autofluoreszenz in allen Kanälen des verwendeten Mikroskops. Vor allem bei Anregung mit blauem Licht (488 nm) war eine kräftige Emission von grünem Licht zu verzeichnen. Die starke Eigenfluoreszenz machte die Erkennung und Darstellung von diskreteren Befunden in der Immunfluoreszenz wegen des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses äußerst schwierig. Deswegen wurde geprüft, ob es eine immunzytochemische Methode gibt, die einerseits vergleichsweise oder höher sensitiv sein

sollte als die Immunfluoreszenz, andererseits aber ein geringeres unspezifisches Hintergrundsignal erzeugen sollte. Hierfür wurde zunächst ein Immunzytochemie-System getestet, bei dem eine an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase das Substrat Diaminobenzidin (DAB) zu einem braunen Produkt umsetzt; als Primärantikörper diente ein Anti-Vimentin Antikörper. Bei dieser Methode gab es zwar ein sehr geringes Hintergrundsignal, jedoch waren die Sensitivität und das strukturelle Auflösungsvermögen unbefriedigend (Abb. 3-2.7, A-C).

Ein anderes Immunzytochemie-System, das auf der Reaktion eines chromogenen Substrats mit einem Alkalische Phosphatase - Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP)-Komplex zu einem intensiv roten Produkt beruht, ergab hingegen sehr gute Ergebnisse: Es war hoch sensitiv, und zeigte ein sehr feines strukturelles Auflösungsvermögen, bei sehr geringen unspezifischen Hintergrundsignalen. Durch Gegenfärbung der Zellen mit Hämalaun (blau) konnte zudem der Signalkontrast erhöht werden (Abb. 3-2.7 D-F).

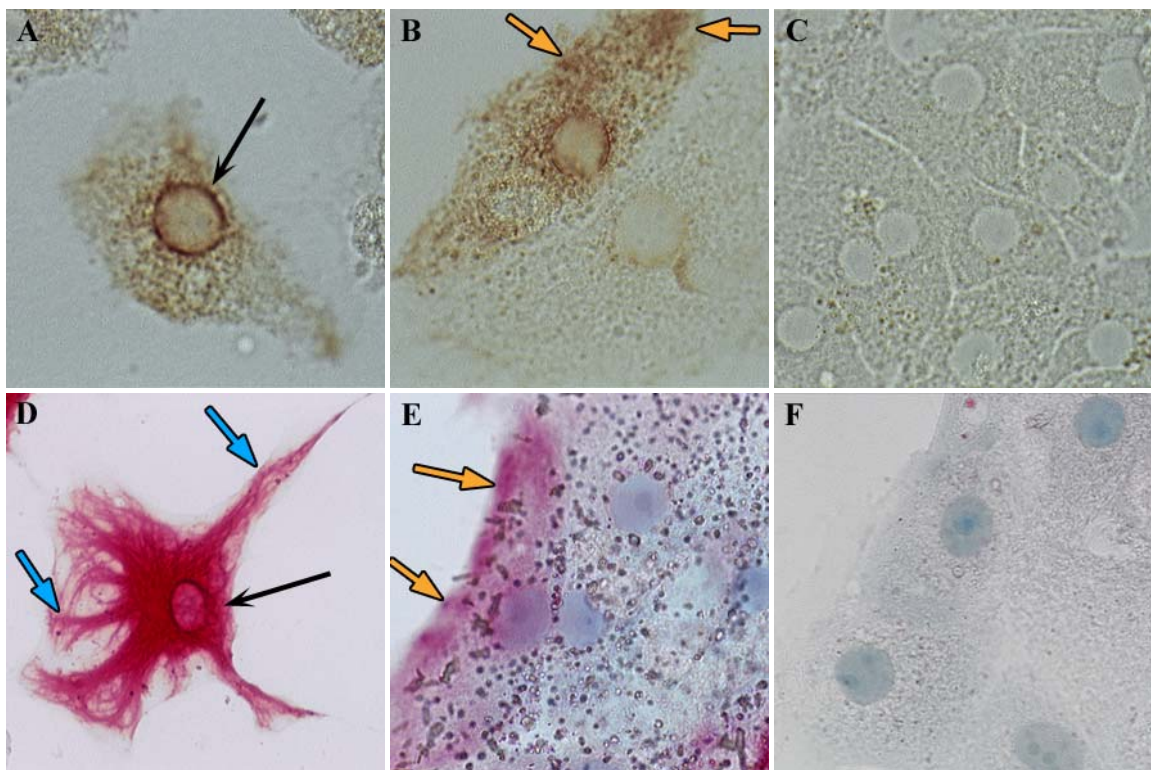


Abb. 3-2.7: Immunzytochemische Darstellung von Vimentin in primären Tupaiahepatozyten. **A, B:** Mit einem DAB-System stellt sich Vimentin braun dar, die Sensitivität ist jedoch relativ gering, ebenso die Signalschärfe. **C** = Negativkontrolle. **D, E:** Sehr sensitive und scharfe Darstellung des Vimentins (rot) mit einem APAAP- System, starker Kontrast durch Gegenfärbung mit Hämalaun (blau). **F** = Negativkontrolle. Hellfeldmikroskopie, Mikroskopvergrößerung 400x bzw. 200x (**D**). In solitär liegenden Zellen deutliche Bündelung des Vimentins (blaue Pfeile) und perinukleäre Verdichtung (schwarze Pfeile), bei Zellverbänden eher verstärkte Ansammlung von Filamenten an den äußeren Zellrändern (orange Pfeile). Vergleiche auch Abb. 3-2.2.

3.3. Infektion primärer Tupaiahepatozyten mit dem humanen Hepatitis B-Virus

Die Infektion mit dem humanen Hepatitis B-Virus (HBV) gilt als hoch speziesspezifisch. Außer Mensch und Schimpanse galten lange Zeit alle anderen Spezies als refraktär für eine Infektion mit HBV *in vivo* oder *in vitro*. Alle etablierten humanen Hepatomzelllinien wie HepG2 oder HuH7 sind nicht suszeptibel für eine Infektion - mit Ausnahme der erst vor kurzem beschriebenen Zelllinie HepaRG (u.a. GRIPON *et al.* 2002), die jedoch beim Erstellen dieser Arbeit nicht zur Verfügung stand. Durch das Fehlen eines geeigneten Zelllinien- oder Kleintiermodells wurde die Erforschung der frühen Infektionsphasen mitsamt der Mechanismen der Virusbindung und -penetration lange Zeit wesentlich erschwert. Mit der Entdeckung der Infizierbarkeit des ostasiatischen Spitzhörnchens *Tupaia belangeri* mit HBV *in vivo* und *in vitro*, ist dies das bisher einzige bekannte Kleintier, das für das Studium der frühen Phasen der HBV-Infektion zur Verfügung steht (u.a. SU 1987, YAN *et al.* 1996, WALTER *et al.* 1996).

Bei den Experimenten im Rahmen dieser Arbeit wurden nur *in vitro*-Infektionen isolierter Tupaiahepatozyten vorgenommen. Alle Tupaia wiesen im Serum weder HBs-Antigen (HBsAg) noch HBV-DNA auf.

Bei der Infektion primärer Tupaiahepatozyten mit HBV unter unterschiedlichen Bedingungen diente der Nachweis von neu synthetisiertem HBsAg als ein Zeichen für eine bestehende akute HBV-Infektion. Dafür wurde das APAAP-Immunzytochemie-System mit einem monoklonalen Anti-HBs-Antikörper als Primärantikörper verwendet (Näheres s. „Material und Methoden“). Die Verwendbarkeit dieses Systems für den Nachweis von intrazellulärem HBsAg wurde zunächst an zwei Hepatomzelllinien etabliert, an transient mit einem HBV-Plasmid (991-T7) transfizierten HuH7-Zellen, sowie an der Zelllinie HepG2.2.15. HuH7-Zellen waren einen Tag nach Auftauen und Kultivierung auf collagenisierten Deckgläschen mit dem 991-T7-Plasmid transfiziert worden, und wurden noch drei Tage in einem Medium mit 1% DMSO weiterkultiviert. Der Transfektionserfolg und die -effizienz waren durch parallele Transfektion eines GFP-Plasmids bestimmt worden, welches für ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) codiert.

HepG2.2.15-Zellen wurden nach Auftauen drei Tage lang auf collagenisierten Deckgläschen in einem Medium mit 1% DMSO kultiviert.

In beiden Versuchsansätzen war das HBsAg intrazellulär deutlich nachweisbar, bei HepG2.2.15-Zellen in jeder Zelle, bei den transfizierten HuH7-Zellen in ca. 7-10% der Zellen; dabei stellte sich das HBsAg vornehmlich als ringförmiger, perinukleärer Saum dar (Abb. 3-3.1).

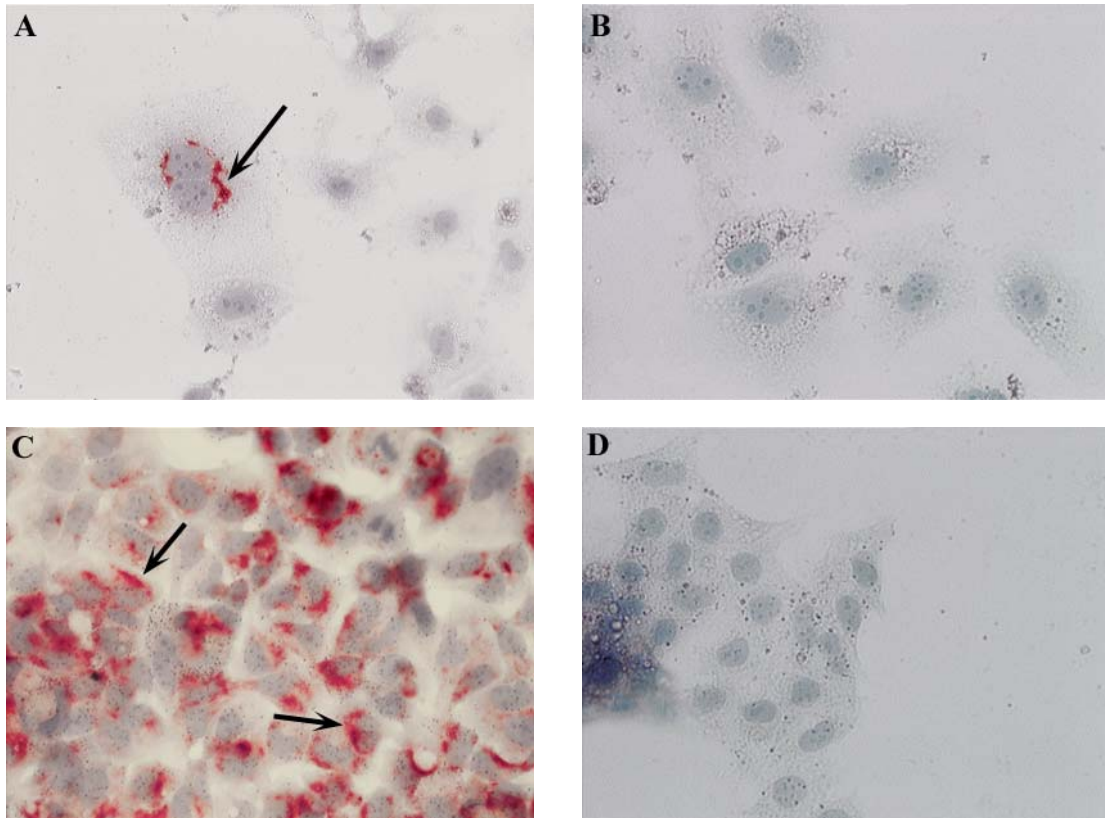


Abb. 3-3.1: Immunzytochemische Darstellung von HBsAg (rot) in Hepatomzelllinien.
A: Transfizierte HuH7-Zellen; **B** = native HuH7-Zellen (Negativkontrolle).
C: HepG2.2.15-Zellen; **D** = HepG2-Zellen (Negativkontrolle).
Häufig Ansammlung des HBsAg in einem perinukleären Saum (Pfeile).
Gegenfärbung mit Hämalaun (blau); Mikroskopvergrößerung 200x.

3.3.1 Infektion mit gereinigten HBV-Präparationen

Im Blut chronisch HBV-infizierter Personen zirkulieren in individuell unterschiedlichen Konzentrationen sowohl infektiöse Viruspartikel, als auch nicht infektiöse subvirale Partikel, die nur aus den Hüllproteinen des Hepatitis B-Virus bestehen. Aus dem Blutserum solcher Personen können mit verschiedenen Methoden Viren und subvirale Partikel hochrein in hohen Konzentrationen extrahiert werden.

Für die folgenden Studien wurden hoch gereinigte Hepatitis B-Viren verwendet, die aus dem Serum eines chronisch HBV-Infizierten („ID 259“) mittels einer Sucrosegradienten-Zentrifugation isoliert worden waren, wie sie bei GLEBE *et al.*

(2003) beschrieben ist. Die Viren hatten den Genotyp D, HBsAg-Subtyp ayw2, das Ursprungsserum wies 2×10^9 HBV-Genome/ml auf, war HBeAg-positiv und enthielt 10µg/ml HBsAg.

a) Infektion frisch isolierter Zellen. Primäre Tupaiahepatozyten wurden nach der Isolation auf collagenisierten Deckgläschen und in Tupaiamedium drei Tage lang kultiviert. Auf jedem Deckgläschen befanden sich ca. 10^3 Zellen. Am dritten Tag wurde das Zellkulturmedium abgenommen, und durch 1ml virushaltiges Infektionsmedium pro Präparat ersetzt.

Zunächst sollte festgestellt werden, wie hoch die Infektionsdosis (in HBV-Genomäquivalenten („genome equivalents“ = ge) pro Zelle) sein muß, damit eine Infektion nachweisbar wird. Hierfür wurden 1 ge / Zelle (entsprechend 10^3 Viren / Zellkulturschale), 10 ge / Zelle (10^4 Viren / ZK-Schale), 100 ge / Zelle (10^5 Viren / ZK-Schale) und 1.000 ge / Zelle (10^6 Viren / ZK-Schale) gewählt. Die Zellen wurden über Nacht (ca. 15h) mit dem virushaltigen Medium inkubiert, anschließend wurde das Inokulat entfernt, die Zellen dreimal mit Medium gewaschen, und für 10 Tage in „Tupaiamedium“ weiterkultiviert. Am Tag 10 *post infectionem* (p.i.) wurden die Deckgläschen mit den Zellen fixiert, und immunzytochemisch HBsAg nachgewiesen.

Es zeigte sich, daß nur in denjenigen Präparaten, die mit 1.000 ge / Zelle inokuliert wurden, Zellen zu sehen waren, die HBsAg-positiv und damit infiziert waren; der Anteil positiver Zellen lag jedoch unter einem Prozent. In den Ansätzen mit 1 bzw. 10 bzw. 100 ge / Zelle war immunzytochemisch kein zellassoziertes HBsAg nachzuweisen.

Als nächstes wurde untersucht, nach welchem Zeitraum *post infectionem* HBsAg in den Zellen nachweisbar wird. Dazu wurden frisch isolierte Tupaiahepatozyten nach obigem Schema mit einer Infektionsdosis pro Zelle („multiplicity of infection“, MOI) von 1.000 inkubiert, die Präparate an den Tagen 1, 3, 6 und 10 p.i. fixiert und immunzytochemisch auf HBsAg untersucht. Bei den Präparaten, die an den Tagen 1, 3 und 6 p.i. fixiert wurden, war kein HBsAg nachweisbar (Abb. 3-3.2). Ab Tag 10 p.i. konnte HBsAg in Tupaiahepatozyten dargestellt werden; der positive Nachweis beschränkte sich jedoch lediglich auf maximal 1% der Zellen, welche praktisch immer inmitten eines größeren Zellverbands lagen.

Bei der intrazellulären Verteilung des HBsAg fiel ein deutlicher, direkt an den Zellkern grenzender Randsaum auf; ansonsten erschien es relativ homogen über das gesamte Zytoplasma verteilt. (Abb. 3-3.3).

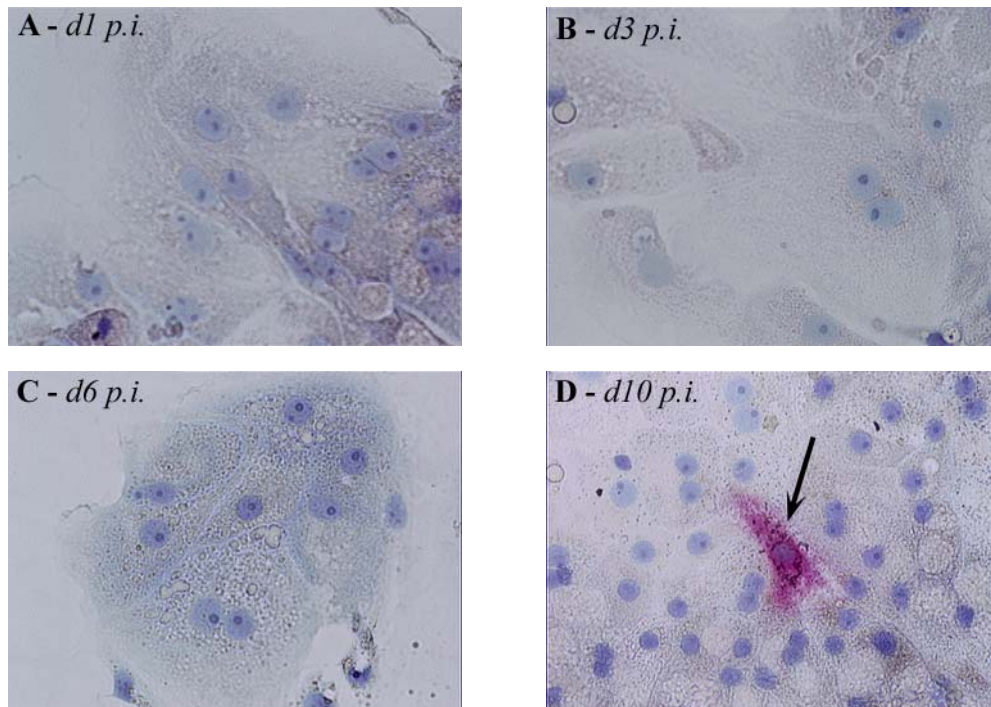


Abb. 3-3.2: Infektion frisch isolierter primärer Tupaiahepatozyten mit gereinigtem HBV (1.000 ge / Zelle).

A, B, C: Der immunzytochemische Nachweis von HBsAg (rot) ist in den ersten 6 Tagen nach Infektion (*d1* - *d6*) noch negativ.

D: Am Tag 10 p.i. (*d10*) sind einzelne HBsAg-positive Zellen erkennbar (Pfeil). Gegenfärbung mit Hämalaun (blau); Mikroskopvergrößerung 200x.

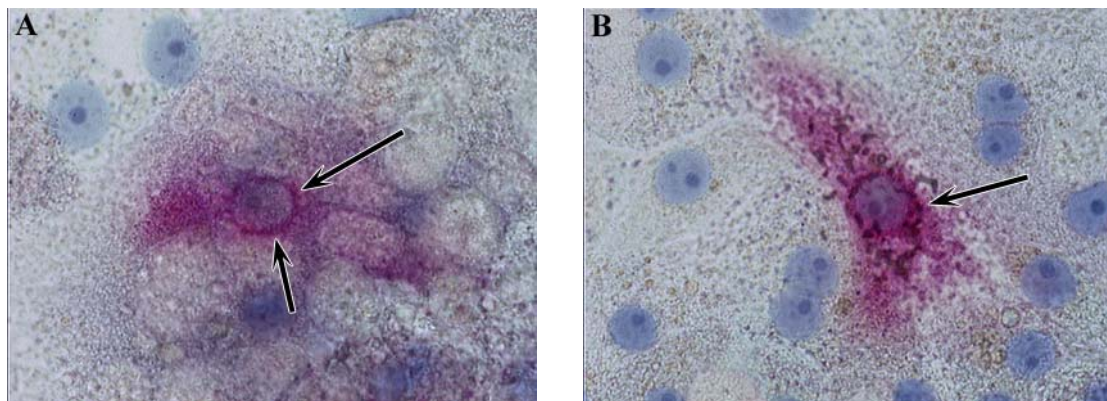


Abb. 3-3.3: Frisch isolierte, mit gereinigtem HBV infizierte Tupaiahepatozyten an Tag 10 p.i.. Immunzytochemischer Nachweis von HBsAg (rot), Gegenfärbung mit Hämalaun (blau).

A, B: Das HBsAg ist fast homogen über das Zytoplasma verteilt, ein besonders intensiver Saum umschließt ringförmig den Zellkern (Pfeile). Mikroskopvergrößerung 400x.

b) Infektion kryopräservierter Zellen. In allen bisher beschriebenen *in vitro*-Infektionen primärer Tupaiahepatozyten mit HBV wurden stets frisch isolierte Zellen verwendet (u.a. WALTER *et al.* 1996, KÖCK *et al.* 2001). Ob kryopräservierte Zellen suszeptibel für eine Infektion sind, war nicht bekannt.

Nach der Etablierung eines geeigneten Protokolles zur Kryopräservierung primärer Tupaiahepatozyten wurde untersucht, ob die Suszeptibilität dieser Hepatozyten für eine HBV-Infektion nach einem Einfrier-Auftau-Zyklus erhalten bleibt. Hierzu wurden Zellen verwendet, die direkt nach der Isolation eingefroren, und mehrere Tage lang bei -165°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden.

Nach dem Auftauen wurden sie auf collagenisierten Deckgläschen drei Tage lang in Tupaiaedium kultiviert; auf jedem Präparat befanden sich ca. 4×10^4 Zellen. Am dritten Tag nach dem Auftauen wurde das Zellkulturmedium abgenommen, und durch jeweils 1ml Infektionsmedium mit 4×10^7 Genomäquivalenten ($1.000 \text{ ge} / \text{Zelle}$) ersetzt. Dieses Medium wurde über Nacht (ca. 15h) auf den Zellen belassen, dann wurden sie dreimal mit Medium gewaschen, anschließend für 10 Tage weiterkultiviert, fixiert, und immunzytochemisch auf HBsAg untersucht.

In den kryopräservierten Zellen war 10 Tage p.i. HBsAg nachweisbar. Hinsichtlich Infektionseffizienz und intrazellulärer Verteilung des HBsAg war kein signifikanter Unterschied zu frisch isolierten Zellen erkennbar; maximal 1% der Zellen waren HBsAg-positiv, und es zeigte sich wieder ein perinukleärer Ring erhöhter Signalintensität (Abb. 3-3.4).

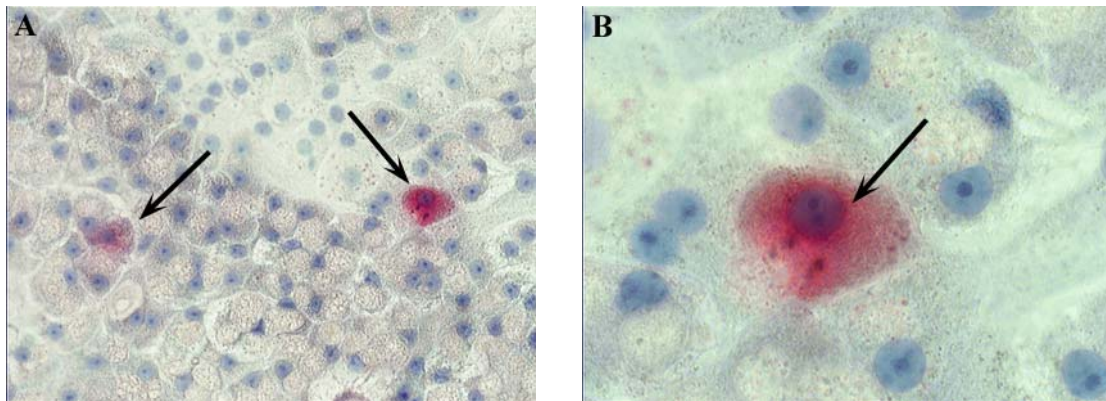


Abb. 3-3.4: Infektion kryopräservierter Tupaiahepatozyten mit gereinigtem HBV. Immunzytochemischer Nachweis von HBsAg (rot) am Tag 10 p.i..
A: Einzelne Zellen weisen HBsAg in ihrem Zytoplasma auf (Pfeile).
B: Bei stärkerer Vergrößerung wird der perinukleäre HBsAg-Saum erkennbar (Pfeil).
Gegenfärbung mit Hämalaun (blau); Mikroskopvergrößerung 200x (A) bzw. 630x (B).

Als nächstes wurde untersucht, in welchem Zeitraum nach dem Auftauen die kryopräservierten Zellen infizierbar sind. Hierfür wurden mehrere Präparate nach obigem Schema an den Tagen 1, 2, 3 und 4 nach dem Auftauen mit gereinigtem HBV inokuliert; am Tag 10 p.i. wurden sie auf HBsAg untersucht.

In allen Präparaten fanden sich HBsAg-positive Zellen, ohne deutliche Unterschiede bezüglich der Infektionseffizienz (Abb. 3-3.5).

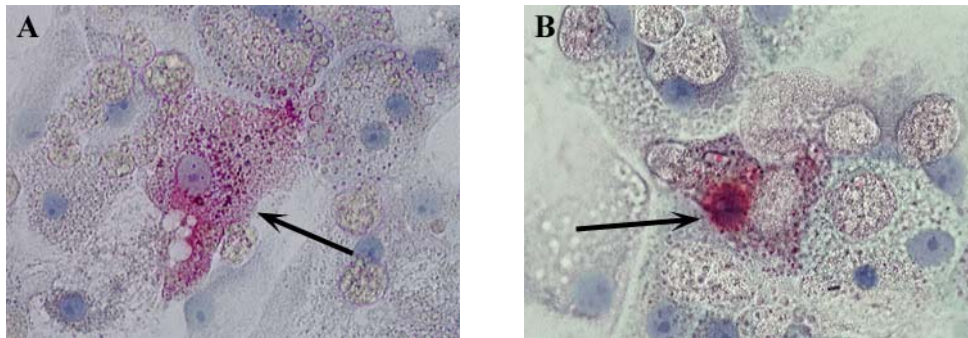


Abb. 3-3.5: Immunzytochemischer Nachweis von HBsAg (rot) in kryopräservierten Tupaiahepatozyten am Tag 10 p.i..
A: Infektion an Tag 1 nach Auftauen; **B:** Infektion an Tag 4 nach Auftauen.
Gegenfärbung mit Hämalaun (blau); Mikroskopvergrößerung 400x.

Zusammenfassend betrachtet, war der HBsAg-Nachweis, als Anzeichen einer Infektion durch gereinigte Hepatitis B-Viren, sowohl in frisch isolierten als auch in kryopräservierten Tupaiahepatozyten prinzipiell möglich. Jedoch war die Effizienz des angewandten Infektionsmodus' sehr gering, meist weniger als ein Prozent beim Einsatz von 1.000 *ge* / Zelle.

3.3.2 Infektion durch HepG2.2.15-Zellkulturüberstand

Die humane Hepatoblastom-Zelllinie HepG2.2.15 produziert sowohl HBV-Virionen, als auch subvirale Partikel, und sezerniert diese in das Zellkulturmedium (SELLS *et al.* 1987). Mit einem solchen Zellkulturüberstand haben ACS *et al.* (1987) *in vivo* Schimpansen infiziert. Ob sich hiermit Tupaias *in vivo* oder primäre Tupaiahepatozyten *in vitro* infizieren lassen, war bisher nicht bekannt, da für solche Versuche bislang ausschließlich Viren aus humanem Serum verwendet wurden. Im Folgenden wurde untersucht, ob sich eine Infektion primärer Tupaiahepatozyten auch mit HepG2.2.15-Zellkulturüberstand erreichen läßt. Die Verwendung dieses Mediums als Virusquelle hat gegenüber menschlichem Serum einige Vor-, aber auch Nachteile, die dem Diskussionsteil dieser Arbeit zu entnehmen sind.

HepG2.2.15-Zellen wurden drei Tage lang auf collagenisierten 60mm-Zellkulturplatten in 5 ml „Tupaia-Infektionsmedium“ mit 1% DMSO kultiviert, das Medium wurde nach dem Anheften der Zellen nicht mehr gewechselt (gegenüber dem eigentlichen „Tupaia-Infektionsmedium“ mit 2% DMSO mußte hier die DMSO-Konzentration auf 1% gesenkt werden, da die HepG2.2.15-Zellen sonst innerhalb kurzer Zeit abstarben).

Wie GLEBE *et al.* (2001) zeigen konnten, wird die Sekretion von Viruspartikeln durch diese Zellkulturbedingungen wesentlich verstärkt. Am dritten Tag wurde das Medium komplett abgenommen, und zur Entfernung von eventuell abgelösten Zellen durch ein Spritzenfilter mit 0,8µm Porengröße filtriert. Als Negativkontrolle diente Zellkulturüberstand von HepG2-Zellen, der nach identischem Procedere behandelt wurde. Der Gehalt an HBsAg in den Überständen wurde mittels ELISA bestimmt, und betrug im HepG2.2.15-Überstand 2,14 µg / l; im HepG2-Überstand war (erwartungsgemäß) kein HBsAg nachweisbar.

Die Virusmenge in den Zellkulturüberständen wurde mittels quantitativer real-time LightCycler-PCR bestimmt (durchgeführt von Frau E. KNOOP), und betrug ca. $1,3 \times 10^7$ ge / ml im HepG2.2.15-Überstand, so daß sich folglich im Inokulat ca. 6×10^6 ge befanden. Dies entspricht einer Infektionsdosis von ca. 150 ge / Zelle. Im HepG2-Überstand war keine HBV-DNA nachweisbar.

Mit jeweils 500 µl des filtrierten Zellkulturüberstandes wurden anschließend primäre Tupaiahepatozyten inkubiert, die drei Tage vorher aufgetaut, und auf collagenisierten Deckgläschen kultiviert wurden. Nach Inkubation über Nacht wurde das Inokulat wieder komplett entfernt, die Zellen dreimal mit Medium gewaschen, weiterkultiviert, und am Tag 10 p.i. fixiert.

In den mit HepG2.2.15-Überstand inkubierten Tupaiahepatozyten konnte am Tag 10 p.i. immunzytochemisch HBsAg nachgewiesen werden (Abb. 3-3.6), jedoch auch hier in weniger als einem Prozent der Zellen. In den mit HepG2-Überstand inkubierten Präparaten war kein HBsAg nachweisbar.

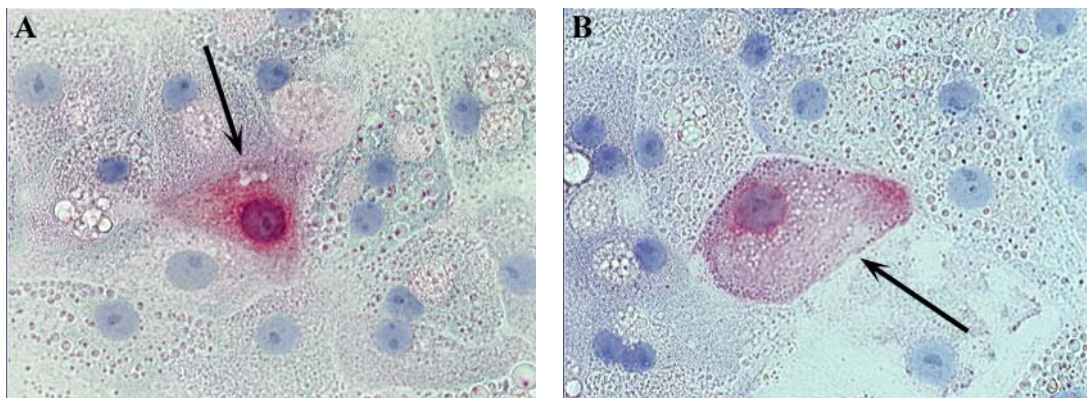


Abb. 3-3.6: Infektion primärer Tupaiahepatozyten durch Inkubation mit HepG2.2.15-Zellkulturüberstand. **A, B:** Immunzytochemischer Nachweis von HBsAg (rot) in einzelnen Zellen (Pfeile) als Anzeichen einer Infektion. Gegenfärbung mit Hämalaun (blau); Mikroskopvergrößerung 400x.

3.3.3 Infektion durch temporäre Co-Kultivierung mit HepG2.2.15-Zellen

Werden unterschiedliche Zelltypen in einer Kultur co-kultiviert, so treten sie in Wechselwirkung untereinander. Daran sind offenbar sowohl membrangebundene, als auch lösliche Faktoren beteiligt (vgl. BHATIA *et al.* 1999). Hier sollte untersucht werden, ob sich die HBV-Infektion primärer Tupaiahepatozyten durch die Möglichkeit der humoralen Interaktion mit HepG2.2.15-Zellen zum Zeitpunkt der Infektion positiv beeinflussen läßt. Dazu wurden Tupaiahepatozyten mit HepG2.2.15-Zellen kurzzeitig co-kultiviert. In diesen Versuchsansätzen wurden zunächst HepG2.2.15-Zellen auf collagenisierte Deckgläschen umgesetzt, und jeweils 8 dieser Deckgläschen in eine 60 mm-Zellkulturschale mit 5 ml Tupaia-Infektionsmedium + 1% DMSO gelegt. Dieses Medium wurde nicht gewechselt. Gleichzeitig wurden primäre Tupaiahepatozyten aufgetaut, und separat auf collagenisierten Deckgläschen kultiviert. Am dritten Tag der Kultivierung wurde jeweils ein Deckgläschen mit Tupaiahepatozyten in eine Zellkulturschale mit HepG2.2.15-Deckgläschen gelegt, über Nacht dort belassen, am nächsten Tag wieder geborgen, dreimal mit Medium gewaschen und für 10 Tage separat weiterkultiviert. Dann wurden die Tupaiazellen fixiert, und immunzytochemisch auf HBsAg untersucht. Zu Vergleichszwecken wurden Tupaiahepatozyten mit HepG2-Zellen co-kultiviert.

In den mit HepG2.2.15-Zellen co-kultivierten Präparaten waren stets HBsAg-positive Zellen nachweisbar; die Infektionseffizienz konnte auf bis zu ca. 4% gesteigert werden (Abb. 3-3.7). Auch hier befanden sich die infizierten Zellen stets in einem größeren Zellverband, und lagen praktisch nie solitär. Bei einer insgesamt intensiveren Anfärbung des HBsAg war der typische perinukleäre Randsaum auch in diesen Zellen deutlich sichtbar. Erstmals wurden auch infizierte Zellen beobachtet, die direkt nebeneinander lagen, oder über zwei Zellkerne verfügten (Abb. 3-3.8).

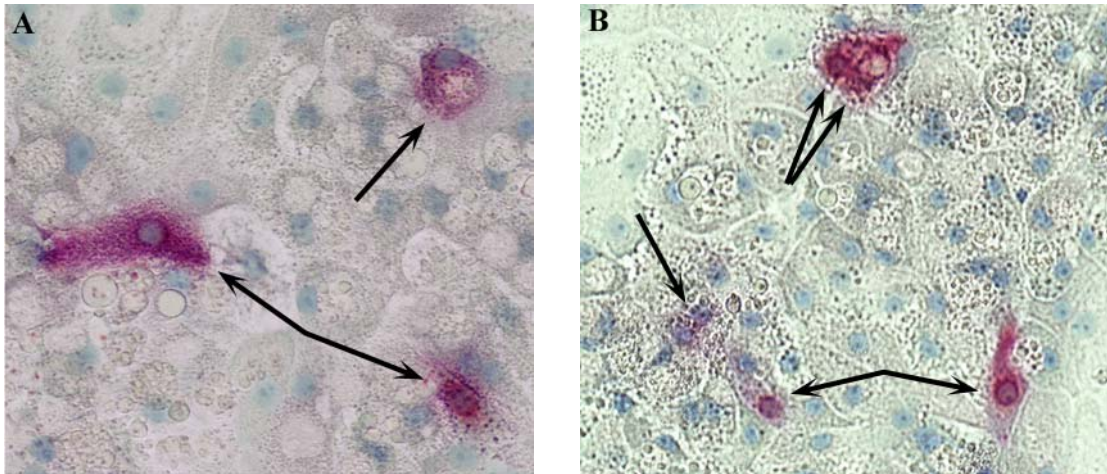


Abb. 3-3.7: Infektion primärer Tupaiahepatozyten durch Co-Kultivierung mit HepG2.2.15-Zellen.

A, B: Immunzytochemischer Nachweis von HBsAg (rot) in ca. 4% der Tupaiahepatozyten eines Präparates (Pfeile). Gegenfärbung mit Hämalaun (blau), Mikroskopvergrößerung 200x.

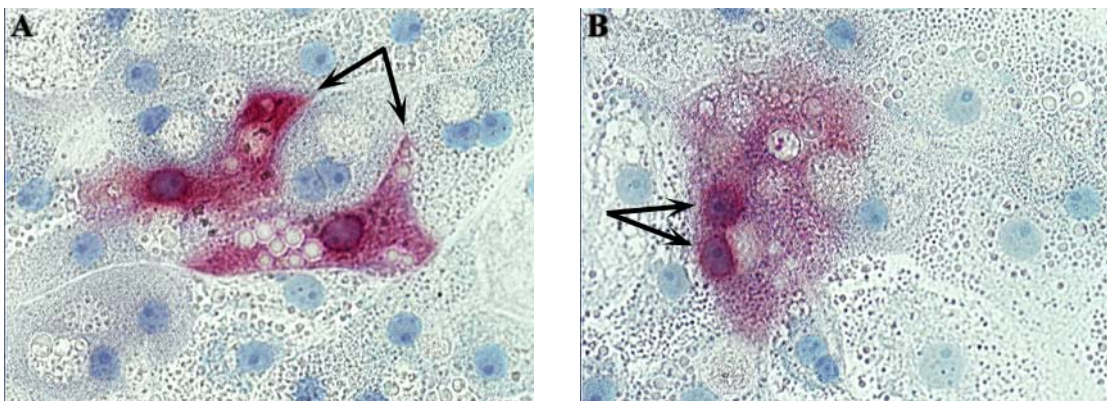


Abb. 3-3.8: Immunzytochemischer Nachweis von HBsAg (rot) in infizierten Tupaiahepatozyten.

A: Infektion von zwei direkt aneinandergrenzenden Zellen (Pfeile)

B: Infektion einer Zelle mit zwei Zellkernen (Pfeile).

Gegenfärbung mit Hämalaun (blau); Mikroskopvergrößerung 400x.

3.3.4 Inhibition der HBV-Infektion primärer Tupaiahepatozyten durch neutralisierende Antikörper

Aus der humanmedizinischen Impfpraxis ist bekannt, daß eine HBV-Infektion sowohl durch aktive Immunisierung mit HBsAg-haltigen Impfstoffen, als auch durch passive Immunisierung mit Anti-HBs-Antikörpern verhindert werden kann.

Bei den Versuchsreihen, in denen primäre Tupaiahepatozyten mit HBV-haltigem Medium inkubiert wurden, wurde zu einigen Inokulaten ein Überschuß an Anti-HBs-Antikörpern gegeben. Bei den Antikörpern handelte es sich einerseits um einen polyklonalen Anti-HBs-Antikörper, der aus dem Serum eines mit HBsAg

immunisierten Schafes durch Natriumsulfat-Fällung extrahiert wurde (GLEBE *et al.* 2003), andererseits um den monoklonalen Antikörper MA 18/07, der an das Epitop DPAF (Aminosäuren 20-23 des Genotyps D) der PräS1-Domäne des LHBs bindet (HEERMANN *et al.* 1984, SOMINSKAYA *et al.* 1992).

Zu den Inokulaten, die entweder gereinigte Viren (bis zu 4×10^7 Genomäquivalente pro Ansatz) enthielten, oder aber aus HepG2.2.15-Zellkulturüberstand bestanden, wurden jeweils 7,5 µg Antikörper gegeben, die Lösungen gut durchmischt, und vor Inokulationsbeginn 30 min. bei Raumtemperatur vorinkubiert.

Ein immunzytochemischer Nachweis von HBsAg in denjenigen Präparaten, bei denen das Virusinokulat mit MA 18/07 oder dem polyklonalen Anti-HBs-Antikörper vorbehandelt wurde, fiel stets negativ aus. Die Infektion wurde durch beide Antikörper gleichermaßen inhibiert.

3.3.5 Nachweis von Hepatitis B-Virus core Antigen (HBcAg) in primären Tupaiahepatozyten

Neben dem Nachweis von HBsAg in Hepatozyten ist der von HBcAg ein weiterer Marker für eine Infektion mit Hepatitis B-Virus. Das HBcAg ist dabei im Zytoplasma und / oder Nukleoplasma der Zellen lokalisiert (NAOUMOV *et al.* 1997).

Unter Verwendung der monoklonalen Anti-HBc-Antikörper C1-5 und 13D3 (Chemicon International) (vgl. auch NAOUMOV *et al.* 1997) sollte versucht werden, immunzytochemisch HBcAg in primären Tupaiahepatozyten nachzuweisen.

Beim Testen der Antikörper an nativen, fixierten Tupaiahepatozyten stellte sich jedoch eine unspezifische, homogene, zytoplasmatische Färbung in der überwiegenden Anzahl der Zellen dar (Abb. 3-3.9), so daß dieser Versuchsansatz nicht weitergeführt wurde.

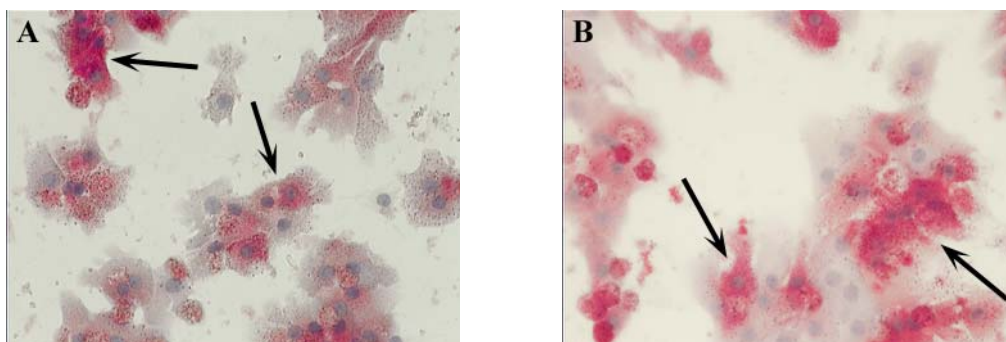


Abb. 3-3.9: Unspezifische, zytoplasmatische Anfärbung (rot, Pfeile) nativer primärer Tupaiahepatozyten nach immunzytochemischer Aufarbeitung mit Anti-HBc-Antikörpern.

A: C1-5 als Primärantikörper; **B:** 13D3 als Primärantikörper.

Gegenfärbung mit Hämalaun (blau); Mikroskopvergrößerung 200x.

3.4. Bindung und Aufnahme von HBsAg

Das Serum chronisch HBV-Infizierter enthält, neben den infektiösen Viren, in einem bis zu 1000-fachen Überschuß auch nicht-infektiöse subvirale Partikel (SVP), die nur aus den Strukturen der Virushülle, also HBsAg, bestehen. Nach Form und Größe unterscheidet man zwischen runden, ca. 22nm großen Partikeln („Sphären“), und den länglichen und größeren „Filamenten“. Während die Sphären ganz überwiegend aus SHBs, wenig MHBs und sehr wenig LHBs bestehen, enthalten Filamente relativ mehr MHBs und LHBs, und entsprechen damit in ihrer Zusammensetzung der Virushülle. (KANN u. GERLICH 1998). Welche Rolle die SVP während der HBV-Infektion spielen, ist noch weitgehend unklar, jedoch wurde in Bezug auf das Hepatitis B-Virus der Ente (DHBV) berichtet, daß SVP *in vitro* eine Infektion verstärken können (BRUNS *et al.* 1998).

Für die folgenden Versuche lagen subvirale Partikel aus dem Plasma eines chronisch HBV-infizierten Spenders („ID 259“) vor, der den HBV-Genotyp D, HBsAg-Subtyp ayw2, aufwies; die SVP waren aus dem Plasma hochrein isoliert worden (zur Methode siehe GLEBE *et al.* 2003). Primär lagen nach der Isolation der SVP zwei Fraktionen vor, eine filamentreiche (im Folgenden nur „Filamente“ genannt), die neben den Filamenten auch Sphären enthielt, und eine mit praktisch ausschließlich Sphären („Sphären“). Das Vorhandensein von SHBs-, MHBs- und LHBs-Proteinen in diesen SVP und das typisches Glykosylierungsmuster der Proteine wurden durch Western Blot-Untersuchungen bestätigt (Abb. 3-4.8). Im weiteren Text werden diese SVP als im weitesten Sinne „native“ SVP bezeichnet werden, um sie von biochemisch modifizierten SVP (s. Kap. 3.4.1.5 - 3.4.1.8) abzugrenzen. Die Proteinkonzentrationen aller SVP-haltigen Lösungen wurden nach GERLICH u. THOMSEN (1975) auf der Grundlage photometrischer Absorptionsmessungen bei 280 nm Lichtwellenlänge (OD280) ermittelt.

In den oben beschriebenen Infektionsversuchen ließen sich maximal ca. 4 - 5% der Tupaiahepatozyten mit HBV infizieren. Im Folgenden sollte die Frage geklärt werden, ob die geringe Infektionseffizienz dadurch zu erklären ist, daß nur ebensowenige Zellen HBsAg binden und / oder aufnehmen können. Hierzu sollten primäre Tupaiahepatozyten unter definierten Bedingungen mit einem HBsAg-haltigen Medium inkubiert, und anschließend eventuell gebundenes oder aufgenommenes HBsAg immunzytochemisch dargestellt werden.

3.4.1 Bindung und Aufnahme von HBsAg durch primäre Tupaiahepatozyten

Im Folgenden wurde untersucht, ob und in welchem Maße primäre Tupaiahepatozyten in der Lage sind, HBsAg zu binden und / oder aufzunehmen.

Für diese Versuche wurden die Tupaiahepatozyten mit definierten Mengen HBsAg in Form subviraler Partikel (SVP) inkubiert, die Zellen anschließend gründlich gewaschen und fixiert. Zellassoziertes HBsAg wurde mittels eines APAAP-Systems und eines Anti-HBs-Antikörpers immunzytochemisch nachgewiesen (Näheres unter „Material und Methoden“).

3.4.1.1 Nachweis der Bindung / Aufnahme von „nativem“ HBsAg

Zunächst sollte festgestellt werden, ob sich die Bindung bzw. Aufnahme von HBsAg durch primäre Tupaiahepatozyten überhaupt immunzytochemisch darstellen läßt. Dazu wurden die Zellen mit großen Mengen „nativer“ Filamente bzw. Sphären inkubiert, nämlich 600 ng (15 ng/µl) pro Deckglaspräparat; auf einem Deckgläschen von 12 mm Durchmesser befanden sich ca. 40.000 Zellen. Nach immunzytochemischer Aufarbeitung ließ sich feststellen, daß sich in vielen, aber nicht allen Zellen HBsAg nachweisen ließ, sowohl nach Inkubation mit Filamenten als auch mit Sphären. Der Anteil HBsAg-positiver Zellen betrug jeweils 60 bis 70%, unabhängig von der Art der SVP (Abb. 3-4.1).

Als nächstes wurde untersucht, ab welcher Menge SVP im Inkubationsmedium HBsAg in den Zellen nachgewiesen werden kann. Dazu wurden collagenisierte Deckgläschen mit jeweils ca. 40.000 Tupaiahepatozyten für 1h bei 37°C mit verschiedenen Mengen an Filamenten inkubiert, nämlich mit 100, 200, 400 und 600 ng (entsprechend 2,5 bzw. 5 bzw. 10 bzw. 15 ng/µl)

Das HBsAg-Signal nach immunzytochemischer Aufarbeitung war bei den Präparaten, die mit 100 und 200 ng Filamenten inkubiert wurden, kaum sichtbar bzw. sehr schwach. Erst bei 400 ng war es von deutlicher Intensität, sehr deutlich war es bei 600 ng.

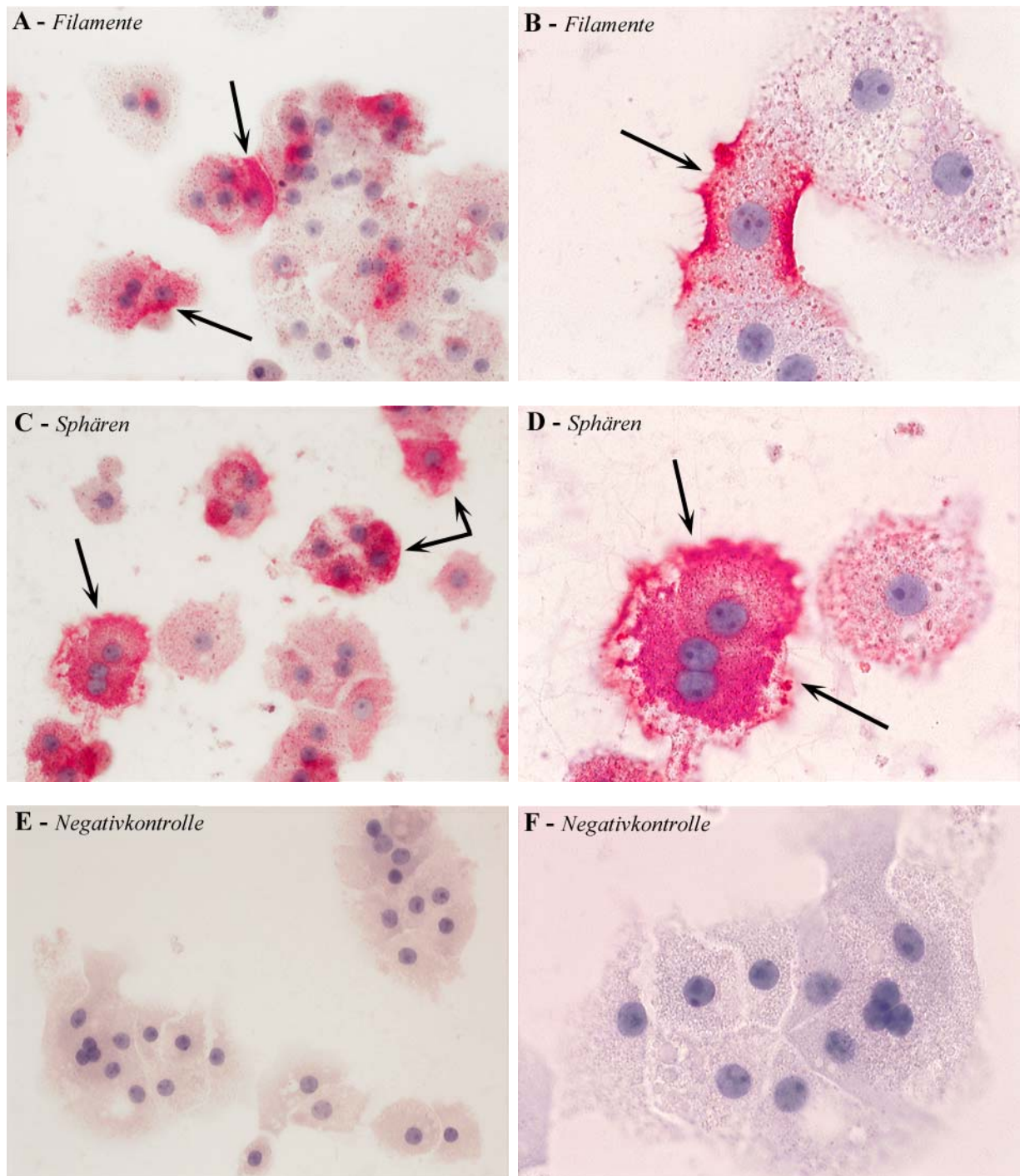


Abb. 3-4.1: Bindung / Aufnahme von subviralen Partikeln durch primäre Tupaiahepatozyten. Immunzytochemischer Nachweis von HBsAg (rot) in multiplen Zellen (Pfeile).

A, B: Inkubation mit 600 ng Filamenten pro Deckglas, 1h bei 37°C.

C, D: Inkubation mit 600 ng Sphären pro Deckglas, 1h bei 37°C.

E, F: In der Negativkontrolle (Inkubation nur mit Medium ohne SVP) bleibt der Nachweis von HBsAg (rot) negativ.

Gegenfärbung mit Hämalaun (blau), Mikroskopvergrößerung 200x (**A, C, E**) bzw. 400x (**B, D, F**).

Diejenigen Zellen, in denen sich HBsAg nachweisen ließ, konnten rein morphologisch keiner bestimmten Subpopulation zugeordnet werden. Sowohl in zusammenhängenden Zellverbänden, als auch bei isoliert nebeneinander liegenden Zellen, fanden sich HBsAg positive Zellen direkt neben negativen (Abb. 3-4.2).

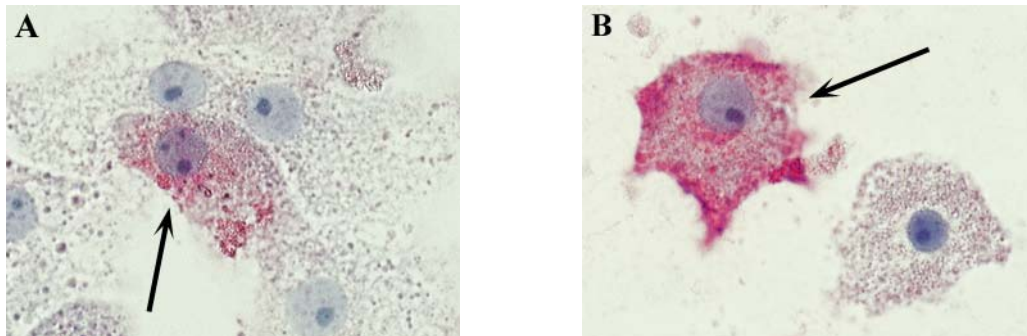


Abb. 3-4.2: Immunzytochemischer Nachweis von HBsAg (rot) in primären Tupaiahepatozyten nach Inkubation mit HBs-Filamenten, 1h bei 37°C.
A: HBsAg positive Zelle (Pfeil), die einen Zellverband eingebettet ist. In den angrenzenden Zellen ist kein HBsAg nachweisbar.
B: Solitär liegende, HBsAg positive Zelle (Pfeil); in der benachbarten Einzelzelle ist kein HBsAg nachweisbar.
 Gegenfärbung mit Hämalaun (blau); Mikroskopvergrößerung 630x.

3.4.1.2 Darstellung des oberflächlich gebundenen HBsAg

Durch die bisherigen Versuche ließ sich nicht zweifelsfrei klären, ob das immunzytochemisch dargestellte HBsAg nur an der Zelloberfläche gebunden oder in die Zelle hinein aufgenommen wurde. Diese Differenzierung ist prinzipiell mit Hilfe der konfokalen Laser-scanning Mikroskopie möglich, was sich praktisch jedoch wegen der oben beschriebenen Probleme mit der Anwendbarkeit dieses Verfahren nicht realisieren ließ. Aus diesem Grunde wurde dazu übergegangen, nur den oberflächlich gebundenen Anteil des HBsAg immunzytochemisch darzustellen. Dazu wurde von zwei unterschiedlichen Verfahren Gebrauch gemacht:

a) Bindung bei 4°C. Bei einer Temperatur von weniger als 10°C ist die Stoffwechselaktivität von Zellen erheblich reduziert. Es findet praktisch keine Stoffaufnahme durch Endozytose mehr statt, während die Bindungsfähigkeit eines extrazellulären Substrates an „seinen“ zellulären Rezeptor jedoch erhalten bleibt (WEIGEL u. OKA 1981). Durch die Inkubation von Tupaiahepatozyten mit HBsAg bei einer Temperatur von ca. 4°C wird folglich die Aufnahme des HBsAg, nicht aber dessen Bindung, verhindert. Hierfür wurde das übliche Inkubationsmedium mit Sphären vorbereitet und eisgekühlt. Die bei 37°C auf Deckgläschen kultivierten primären Tupaiahepatozyten wurden aus

den Zellkulturschalen geborgen, mit eiskaltem Medium gewaschen, mit Inkubationsmedium versehen (400 ng SVP/Deckgläschen), und für 2 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden sie mit eiskaltem Medium gründlich gewaschen, sofort fixiert, und dem immunzytochemischen Nachweis von HBsAg zugeführt.

Dabei zeigte sich, daß HBsAg ausschließlich als dünner, dem Plasmalemm anliegender Saum in der Zellperipherie nachweisbar war, nicht jedoch in zentraleren Kompartimenten des Zytoplasmas. (Abb. 3-4.3).

b) Nicht-Permeabilisierung der Präparate. Primäre Tupaiahepatozyten wurden nach üblichem Procedere kultiviert, und für eine Stunde bei 37°C mit 400ng HBs-Sphären pro Deckglaspräparat inkubiert, anschließend gründlich mit Zellkulturmedium gewaschen und mit Paraformaldehyd fixiert.

Beim nachfolgenden immunzytochemischen HBsAg-Nachweis wurden die Zellen jedoch nicht, wie sonst üblich, mit Triton X-100 permeabilisiert, sondern sofort mit dem Anti-HBs Primärantikörper inkubiert. Durch die nicht erfolgte Permeabilisierung blieb die Plasmamembran der Zellen, die eine Diffusionsbarriere für Antikörper darstellt, erhalten. So konnten die Primärantikörper nur an oberflächlich gebundenes HBsAg binden, nicht jedoch an internalisiertes, intrazellulär liegendes. Auch in diesen Präparaten war HBsAg nur als eine Art saumförmige Umrandung der Zelle in der Peripherie nachweisbar, und nicht in zentralen Kompartimenten (Abb. 3-4.4). Bei denjenigen Präparaten, die nur gebundenes HBsAg darstellen, findet sich also ein rein „peripheres Verteilungsmuster“ des HBsAg. Dieses unterscheidet sich deutlich von den sonst gefundenen Verteilungsmustern, bei denen häufig HBsAg im gesamten Zytoplasma der Zellen dargestellt werden kann (Abb. 4-4.1); vgl. auch Abb. 3-4.1 u. Abb. 3-4.2).

Damit ist davon auszugehen, daß primäre Tupaiahepatozyten subvirale Partikel nicht nur binden, sondern auch aufnehmen.

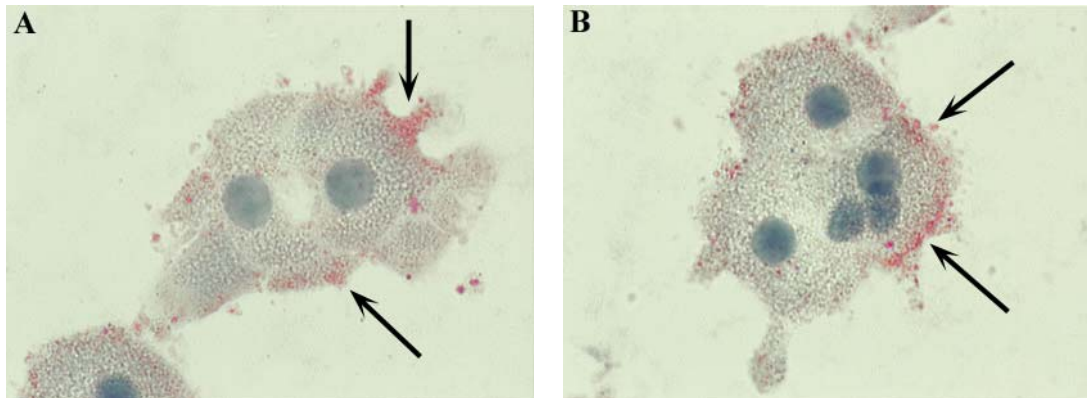


Abb. 3-4.3: Bindung von HBsAg an primäre Tupaiahepatozyten bei 4°C.
A, B: HBsAg (rot) ist nur in der Peripherie der Zellen immunzytochemisch nachweisbar, teilweise an Zellfortsätzen (Pfeile), nicht jedoch im Zentrum. Gegenfärbung mit Hämalan (blau), Mikroskopvergrößerung 400x.

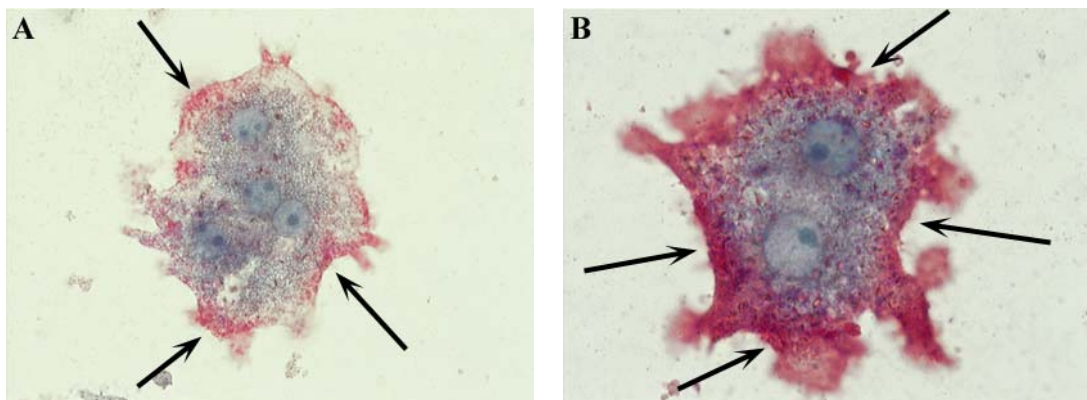


Abb. 3-4.4: Bindung von HBsAg an primäre Tupaiahepatozyten.
A, B: Darstellung nur des oberflächlich gebundenen HBsAg (rot) durch Nicht-Permeabilisierung der Zellen vor der immunzytochemischen Färbung. Das HBsAg ist nur als schmaler Saum in der Zellperipherie nachweisbar (Pfeile), nicht aber im Zentrum der Zellen. Gegenfärbung mit Hämalan (blau), Mikroskopvergrößerung 200x (A) bzw. 400x (B).

3.4.1.3 Verbleib des aufgenommenen HBsAg

Was mit dem HBsAg nach seiner Aufnahme in Hepatozyten geschieht, ist bisher nicht bekannt. Im Folgenden wurde untersucht, bis zu welcher Zeit nach Inkubationsende das von den Zellen aufgenommene HBsAg nachweisbar bleibt.

Hierzu wurden primäre Tupaiahepatozyten auf collagenisierten Deckgläschen für eine Stunde bei 37°C mit 400 ng Sphären pro Deckgläschen inkubiert; danach wurde das Inkubationsmedium vollständig abgenommen, die Zellen dreimal mit Zellkulturmedium gewaschen, und anschließend für zwei Stunden bzw. über Nacht (ca. 15h) in Tupaiaedium weiterkultiviert. Nach dieser Zeit wurden sie fixiert, und der immunzytochemischen Aufarbeitung zum Nachweis von HBsAg zugeführt.

In den Zellen, die für zwei Stunden weiterkultiviert wurden, war bereits kein HBsAg mehr nachweisbar (Abb. 3-4.5), auch nicht bei denen nach Weiterkultivierung über Nacht.

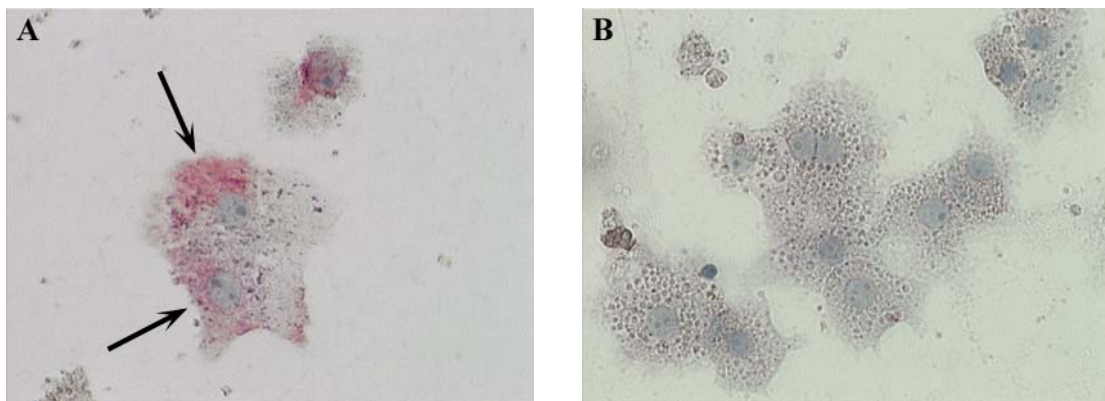


Abb. 3.4-5: Verschwinden der immunzytochemischen Nachweisbarkeit aufgenommenen HBsAg in primären Tupaiahepatozyten bei Weiterkultivierung der Zellen nach Inkubationsende.

A: Bei Fixierung der Präparate direkt nach Inkubationsende ist in den Zellen HBsAg (rot, Pfeile) nachweisbar.

B: Werden die Präparate nach Inkubationsende für 2 h bei 37°C weiterkultiviert, und erst dann fixiert, so ist kein HBsAg mehr nachweisbar.

Gegenfärbung mit Hämalaun (blau), Mikroskopvergrößerung 200x.

3.4.1.4 Inhibition der Bindung von HBsAg an Tupaiahepatozyten

Als nächstes wurde untersucht, ob die Bindung subviraler Partikel an Tupaiahepatozyten spezifisch inhibiert werden kann. Dazu wurde einerseits ein polyklonaler Anti-HBs-Antikörper verwandt, der aus dem Serum eines mit humanen SVP immunisierten Schafes gewonnen wurde. Andererseits wurde als kompetitiver Inhibitor ein rekombinant hergestelltes myristoyliertes Polypeptid eingesetzt, das in der Primärstruktur den Aminosäuren 2-48 des humanen HBsAg (Genotyp D, Subtyp ayw2) entspricht.

a) *Inhibition durch Antikörper.* Wie gezeigt werden konnte, kann die Infektion primärer Tupaiahepatozyten mit dem humanen Hepatitis B-Virus durch die Zugabe eines polyklonalen Anti-HBs-Antikörpers verhindert werden (vgl. Kapitel 3.3.4). Nun wurde untersucht, wie die Bindung und Aufnahme subviraler Partikel durch die Anwesenheit dieses Antikörpers im Inkubationsmedium beeinflusst wird. Dazu wurde zum Inkubationsmedium mit 600ng HBsAg ein Überschuß an Antikörper gegeben (7,5 µg), die Lösungen gut durchmischt, und vor Inkubationsbeginn 30 min. lang bei Raumtemperatur präinkubiert. Als Negativkontrolle wurde anstatt des Anti-HBs-Antikörpers ein monoklonaler Anti-HBc-Antikörper eingesetzt, der nicht spezifisch an HBsAg bindet.

Primäre Tupaiahepatozyten auf collagenisierten Deckgläschen wurden eine Stunde bei 37°C mit diesen Lösungen inkubiert, anschließend gewaschen und fixiert. Der immunzytochemische Nachweis von HBsAg fiel in denjenigen Präparaten negativ aus, bei denen eine Präinkubation der SVP mit dem Anti-HBs-Antikörper stattfand. Die Präinkubation der SVP mit dem bindungstechnisch irrelevanten Anti-HBc-Antikörper hatte keinen Effekt auf die Bindung und Aufnahme der SVP. (Abb. 3-4.6).

Die Inkubation von Tupaiahepatozyten mit einem Medium, das nur den in der Negativkontrolle verwandten Anti-HBc-Antikörper, nicht jedoch HBsAg enthielt, führte zu keiner immunzytochemischen Anfärbung der Zellen.

Zu einer solchen „unspezifischen“ Färbung, die wahrscheinlich auf einer Kreuzreaktion des Antikörpers mit zellulären Epitopen beruht, kam es jedoch bei Inkubation der Zellen mit dem monoklonalen Antikörper MA 18/07 aus der Maus. Deswegen konnten Inhibitionsversuche mit diesem Antikörper nicht durchgeführt werden.

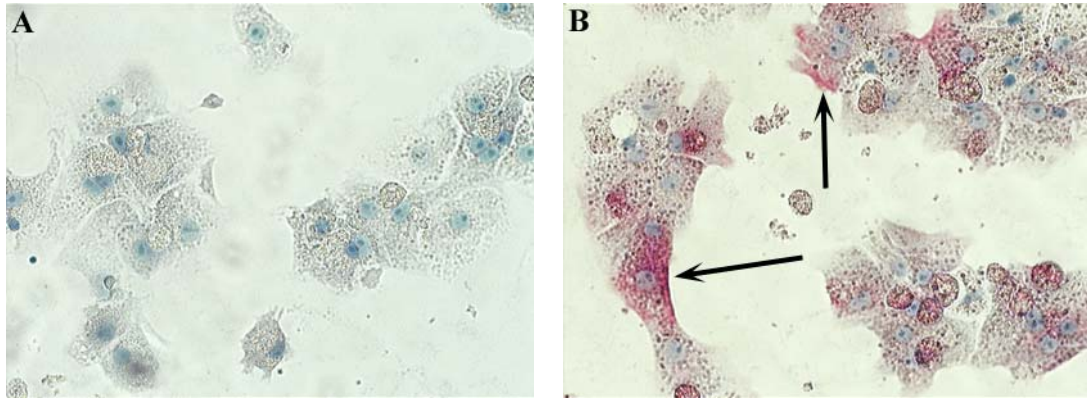


Abb. 3-4.6: Inhibition der Bindung von SVP an primäre Tupaiahepatozyten durch Antikörper.

A: Werden die SVP erst mit einem polyklonalem Anti-HBs-Antikörper präinkubiert, und anschließend die Tupaiahepatozyten damit inkubiert, läßt sich eine Bindung oder Aufnahme von HBsAg (rot) immunzytochemisch nicht nachweisen.

B: In der Negativkontrolle (Präinkubation der SVP mit Anti-HBc) ist zellgebundenes HBsAg (rot) deutlich nachweisbar.

Gegenfärbung mit Hämalaun (blau), Mikroskopvergrößerung 200x.

b) Inhibition durch myristoylierte PräS1-Peptide. Aus dem Modell des Enten-Hepatitis B-Virus (DHBV) ist bekannt, daß eine Infektion mit diesem Virus durch synthetische, myristoylierte Peptide, die bezüglich der Aminosäuresequenz der PräS-Domäne des LDHBs-Proteins entsprechen (PräS-Peptide), kompetitiv inhibiert werden kann (URBAN u. GRIPON 2002). Dementsprechende, dem LHBs-Protein des humanen Hepatitis B-Virus analoge Peptide haben die Aminosäuresequenz der PräS1-Domäne (PräS1-Peptide), und sind ebenfalls an Aminosäure 2 myristoyliert. Für die folgenden Versuche wurden Peptide eingesetzt, die von Herrn PD Dr. Stephan URBAN, Heidelberg, freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Zum einen handelte es sich um ein myristoyliertes PräS1-Peptid des humanen HBV mit den Aminosäuren 2-48 (HuPreS2-48^{myr}), zum anderen um ein myristoyliertes PräS-Peptid des DHBV (DuPreS2-41^{myr}). Es sollte untersucht werden, ob diese Peptide die Bindung und Aufnahme von HBsAg in Form von subviralen Partikeln (kompetitiv) inhibieren können, wobei DuPreS2-41^{myr} die Negativkontrolle sein sollte.

Um möglichst viele Bindestellen für das HBsAg auf den Tupaiahepatozyten kompetitiv zu blockieren, wurden die auf collagenisierten Deckgläschen kultivierten Zellen zunächst mit jeweils 1µM Peptid im Inkubationsmedium für 30 min. bei 37°C präinkubiert, anschließend gewaschen, und für 1h bei 37°C mit 600ng HBsAg in Form von Sphären oder Filamenten + 1µM Peptid inkubiert. Danach wurde das Inkubationsmedium vollständig abgenommen, die Präparate gewaschen, fixiert, und zum Nachweis von HBsAg immunzytochemisch aufgearbeitet.

Befand sich nach Präinkubation mit HuPreS2-48^{myr} neben HBs-Filamenten gleichzeitig HuPreS2-48^{myr} im Inkubationsmedium, so stellte sich die Bindung und Aufnahme von HBsAg durch die Tupaiahepatozyten deutlich schwächer dar als in der Positivkontrolle, die nur mit SVP inkubiert wurde. Die Verwendung von HBs-Sphären anstelle von Filamenten führte dazu, daß in den Tupaiahepatozyten kein HBsAg mehr nachgewiesen werden konnte (Abb. 3-4.7).

Fanden Präinkubation und Inkubation in Anwesenheit von DuPreS2-41^{myr} statt, war in den Präparaten kein Unterschied zur Positivkontrolle erkennbar; dieses Peptid konnte also die Bindung und Aufnahme der SVP nicht inhibieren. Eine Inkubation der Zellen nur mit DuPreS2-41^{myr} führte zu keiner Anfärbung, so daß ausgeschlossen werden konnte, daß eventuell das DuPreS2-41^{myr} zu einer falsch-positiven Nachweisreaktion geführt hat.

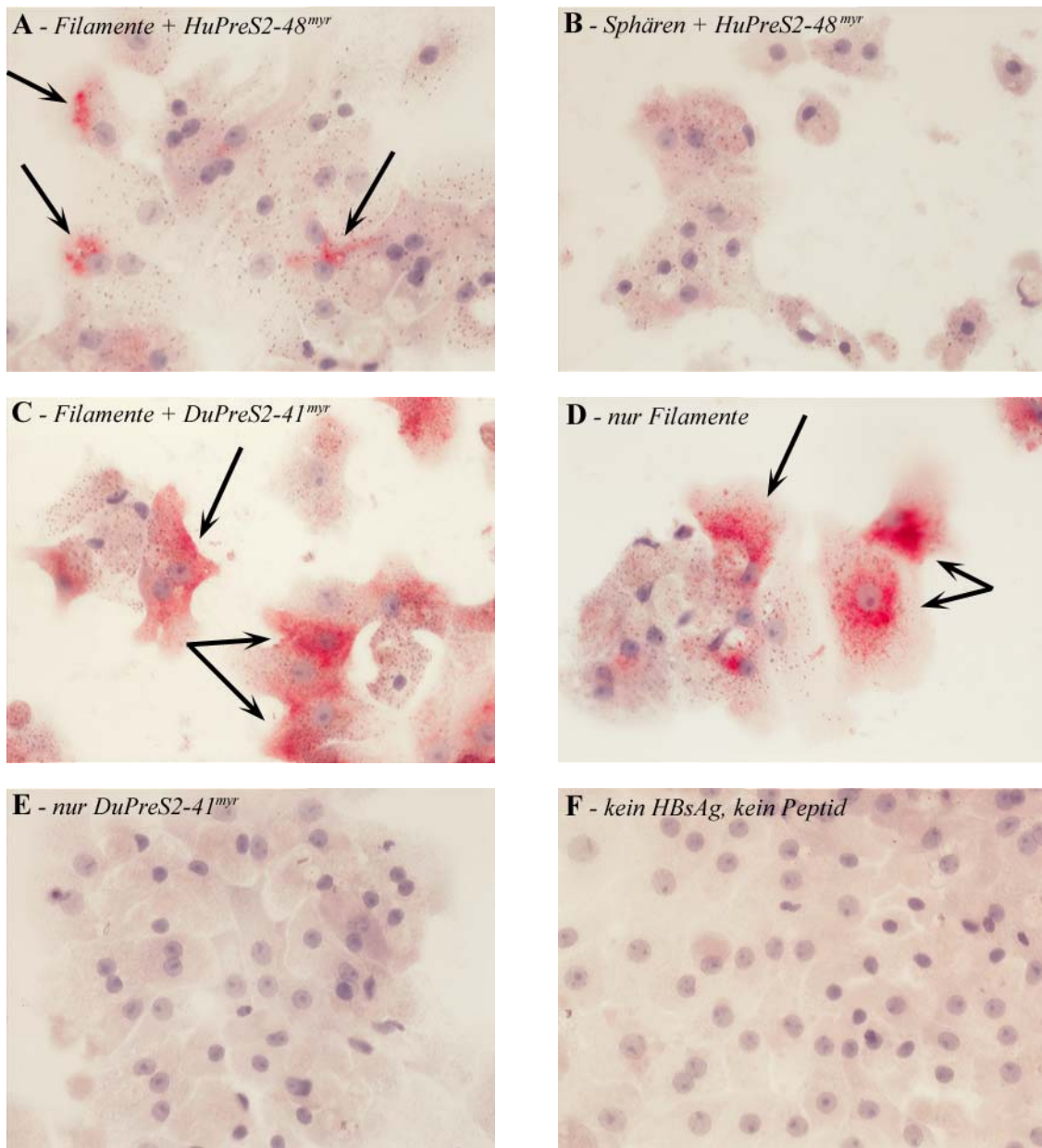


Abb. 3-4.7: Inhibition der Bindung von SVP an Tupaiahepatozyten durch myristoylierte PräS1-Peptide. Immunzytochemischer Nachweis von HBsAg (rot).

A, B: Werden die Hepatozyten mit HuPreS2-48^{myr} präinkubiert, und anschließend in Anwesenheit von HuPreS2-48^{myr} mit SVP inkubiert, läßt sich nur wenig (**A**) bzw. gar kein (**B**) zellgebundenes HBsAg darstellen, je nach Art der SVP (HBs-Filamente oder - Sphären).

C, D: Die Präinkubation mit DuPreS2-41^{myr} und Anwesenheit dieses Peptides während der Inkubation mit SVP hat keinen nachweisbaren Effekt auf die Bindung der SVP (**C**); HBsAg ist genauso intensiv darstellbar wie bei Inkubation ausschließlich mit SVP, ganz ohne Peptide (Positivkontrolle, **D**).

E: DuPreS2-41^{myr} selbst stellt sich in der Immunzytochemie nicht dar, so daß die rote Färbung in **C** nicht daher rühren kann.

F: Negativkontrolle (keine SVP, keine Peptide).

Gegenfärbung mit Hämalaun (blau), Mikroskopvergrößerung 200x.

3.4.1.5 Bindung / Aufnahme von nicht-nativem (modifiziertem) HBsAg - desialylierte subvirale Partikel

Ein Teil der gereinigten Filamente war durch Behandlung mit Sialidase aus *Arthrobacter ureafaciens* enzymatisch desialyliert worden („desialylierte Filamente“). Die erfolgreiche Desialylierung war im Western Blot des HBsAg dargestellt worden (Abb. 3-4.8).

Durch partiellen Verdau mit Trypsin waren aus Teilen dieser desialylierten Filamente SVP erzeugt worden, die weder PräS1- noch vollständige PräS2-Sequenzen enthielten, also aus desialyliertem SHBs plus einer unvollständigen PräS2-Dömane bestanden (Abb. 3-4.8; zu den Enzym-Schnittstellen siehe Kap. 3.4.1.7).

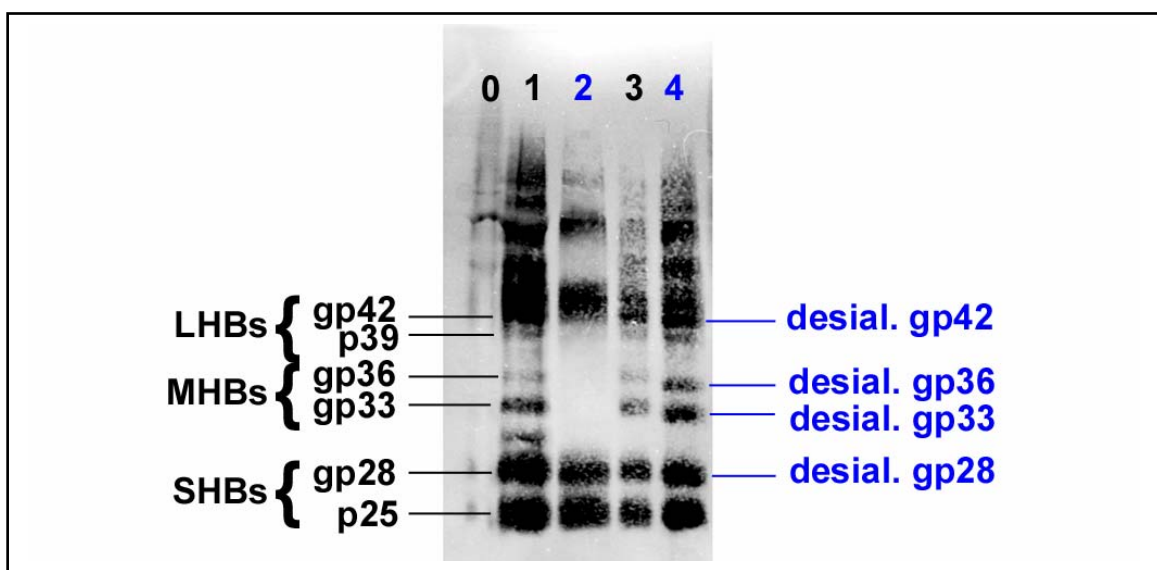


Abb. 3-4.8: SDS-PAGE-Analyse der eingesetzten subviralen Partikel. Silberfärbung. Die unterschiedlichen Glykosylierungszustände der HBs-Proteine kommen deutlich in Form von Doppelbanden zur Darstellung (p25/gp28 bzw. gp33/gp36 bzw. p39/gp42; p = Protein, gp = Glykoprotein, Zahlen = Molekulargewicht).
Reihen **1, 3**: „Native“ subvirale Partikel (Sphären)
Reihe **2**: Desialylierte trypsinierte subvirale Partikel. Die Banden für MHBs und LHBs fehlen, was die erfolgreiche proteolytische Spaltung durch Trypsin anzeigt.
Reihe **4**: Desialylierte subvirale Partikel. Als Zeichen der erfolgreichen Desialylierung und damit höherer Wanderungsgeschwindigkeit im SDS-Gel stehen die Banden der desialylierten Glykoproteine (desial. gp) tiefer als bei den nativen SVP (vgl. Reihe **3**).
Reihe **0**: Protein-Marker.

Um festzustellen, ob und gegebenenfalls wie sich das beobachtete Bindungs- bzw. Aufnahmeverhalten ändert, wenn man die Oberflächenstrukturen subviraler Partikel chemisch modifiziert, wurden Tupaiahepatozyten unter den üblichen Bedingungen (s. „Material und Methoden“) mit Filamenten inkubiert, die enzymatisch desialyliert worden waren. Desialylierte Proteine könnten im Allgemeinen, weitgehend unabhängig von ihrer Proteinstruktur, fakultativ über den Asialoglykoproteinrezeptor aufgenommen werden.

Die Aufnahme der desialylierten Filamente durch primäre Tupaiahepatozyten konnte immunzytochemisch ebenso nachgewiesen werden wie diejenige der nativen SVP, ohne daß sich der Anteil HBsAg-positiver Zellen oder die Signalstärke deutlich änderte (Abb. 3-4.9). Hierbei war jedoch zunächst nicht klar, ob es sich um eine spezifische Aufnahme über den putativen HBV-Rezeptor oder eine „unspezifische“ Internalisation der SVP über den Asialoglykoproteinrezeptor handelte, oder eventuell einer Kombination aus beidem.

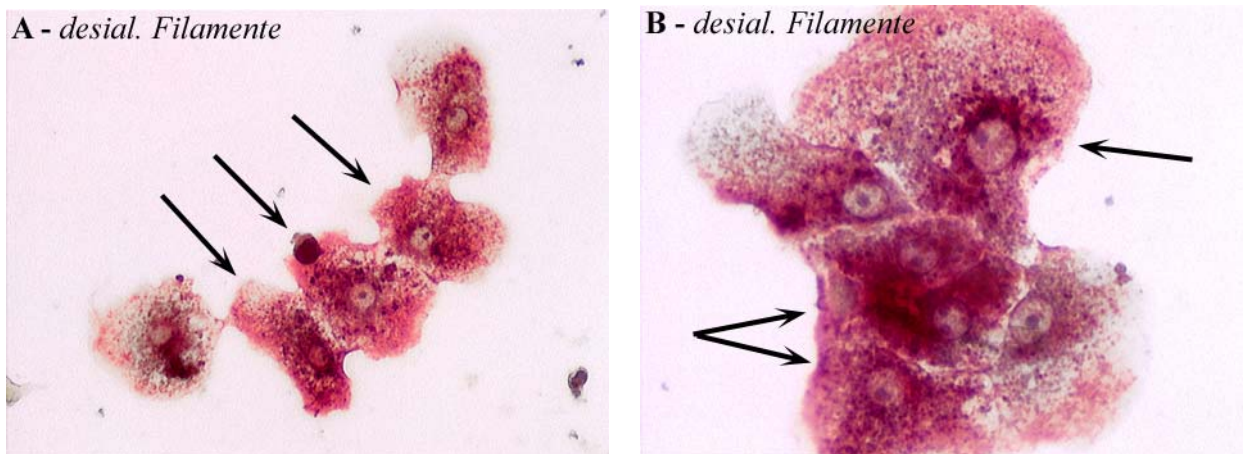


Abb. 3-4.9: A, B: Bindung / Aufnahme von desialylierten HBs-Filamenten durch primäre Tupaiahepatozyten. Immunzytochemischer Nachweis von HBsAg (rot) in einem Großteil der Zellen (Pfeile). Schwache Gegenfärbung mit Hämalaun (blau), Mikroskopvergrößerung 200x (A) bzw. 400x (B).

3.4.1.6 Inhibition der Bindung desialylierter SVP an primäre Tupaiahepatozyten

Wie bereits in Kapitel 3.2 beschrieben, werden sowohl desialylierte als auch lactosylierte Proteine über den Asialoglykoproteinrezeptor (ASGPR) aufgenommen. Mit einem Überschuß desialylierter bzw. lactosylierter Fremdproteine, die mit den desialylierten SVP um die Bindung an den ASGPR konkurrieren, sollte es möglich sein, die endozytotische Aufnahme dieser SVP über den ASGPR kompetitiv zu inhibieren - wenn die desialylierten SVP ausschließlich über den ASGPR aufgenommen werden.

Aus diesem Grund wurden primäre Tupaiahepatozyten auf collagenisierten Deckgläschen mit jeweils 8 µg bovinem Asialofetuin bzw. 8 µg bovinem lactosyliertem Albumin für 30 min. bei 37°C präinkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Zellkulturmedium wurden sie mit je 400 ng desialylierten Filamenten + 8 µg Asialofetuin bzw. 8 µg lactosyliertem Albumin für 1 h bei 37°C inkubiert, danach wiederum gewaschen, fixiert und immunzytochemisch aufgearbeitet.

Durch die extensive Inkubation mit Fremdprotein als kompetitiven Inhibitor bei einem Massenverhältnis Fremdprotein : desialylierte SVP von 20:1 sollte eine umfangreiche Inhibition der SVP-Bindung an die Hepatozyten erreicht werden. Um auszuschließen, daß eine Inhibition allein durch die Anwesenheit großer Mengen Fremdproteins bedingt wird, wurde in der parallel durchgeführten Negativkontrolle das Asialofetuin durch äquivalente Mengen bovines Fetuins ersetzt, das lactosylierte Albumin durch bovines maltosyliertes Albumin. Weder Fetuin noch maltosyliertes Albumin werden über den ASGPR aufgenommen, wirken also nicht als kompetitive Inhibitoren.

Der immunzytochemische HBsAg-Nachweis in den Präparaten zeigte in allen Versuchsansätzen eine deutliche Bindung und Aufnahme der desialylierten SVP. Keines der Fremdproteine führte zu einer erkennbaren Inhibition der Bindung der SVP (Abb. 3-4.10; vgl. auch Abb. 3-4.9). Dies macht eine essentielle Beteiligung des ASGPR an der Bindung und Aufnahme desialylierter SVP durch primäre Tupaiahepatozyten unwahrscheinlich.

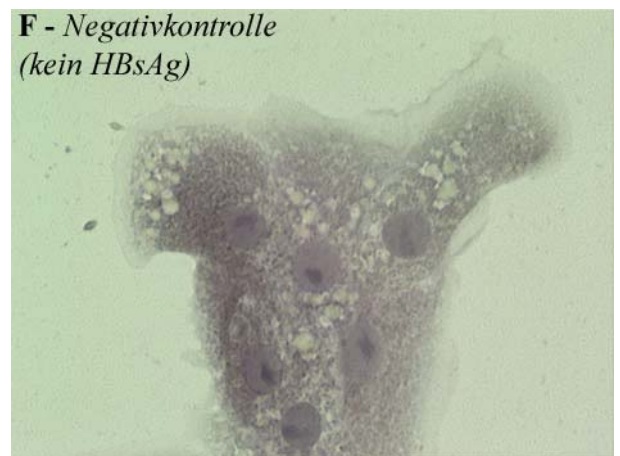
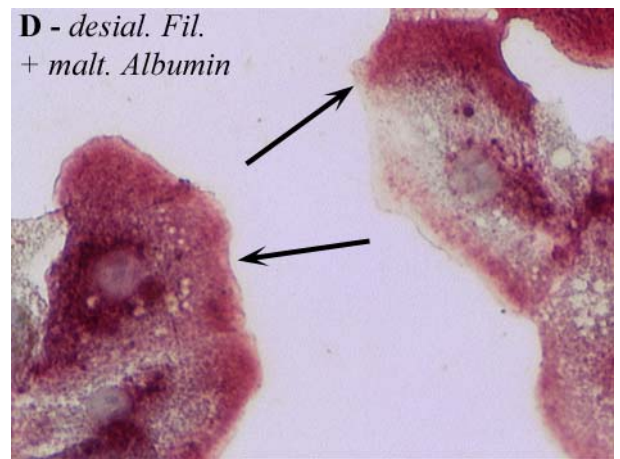
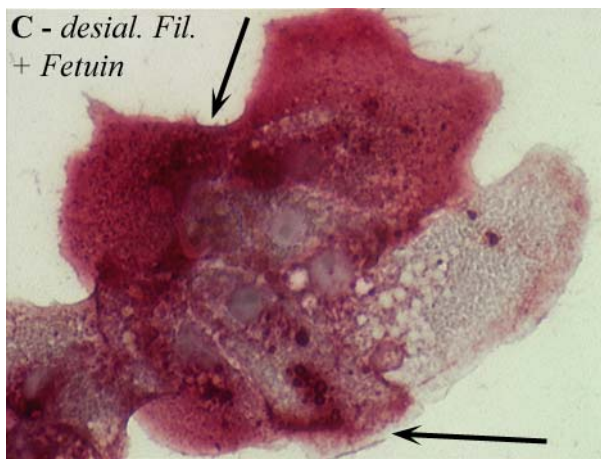
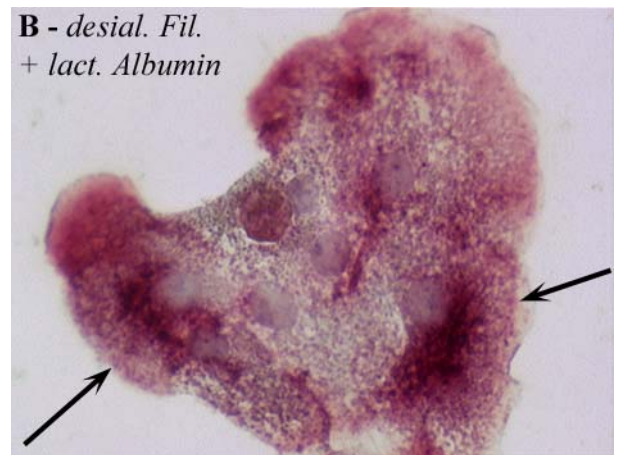
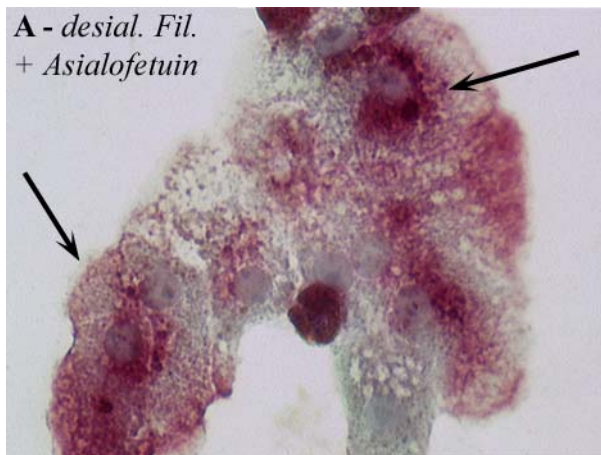


Abb. 3-4.10: Erfolgreiche kompetitive Inhibition der Bindung / Aufnahme desialylierter SVP durch Tupaiahepatozyten. Immunzytochemischer Nachweis von HBsAg (rot).
A, B: Trotz des 20-fachen Überschusses eines kompetitiven Inhibitors des Asialoglykoproteinrezeptors werden desialylierte SVP aufgenommen (Pfeile).
 Die Intensität des HBsAg-Signals ist nicht stärker als in den Vergleichspräparaten mit äquivalenten Konzentrationen nicht inhibierender Fremdproteine (**C, D**), bzw. als in der Positivkontrolle ohne jegliche Fremdproteine (**E**). **F:** Negativkontrolle (keine SVP).
 Gegenfärbung mit Hämalaun (blau); Mikroskopvergrößerung 200x.

3.4.1.7 Bindung / Aufnahme von nicht-nativem (modifiziertem) HBsAg - trypsinisierte und V8-verdaute subvirale Partikel

Trypsin katalysiert die proteolytische Spaltung von Peptidbindungen hinter basischen Aminosäuren wie Lysin und Arginin, die Protease V8 die Spaltung hinter Glutaminsäure. Im Falle des HBsAg erfolgt eine Spaltung hinter Arginin-47 der PräS2-Domäne von LHBs- und MHBs-Proteinen durch Trypsin, während V8 eine Spaltung hinter Glutaminsäure-57 der PräS2-Domäne verursacht (STIBBE u. GERLICH 1983). Dadurch kommt es zum Verlust der PräS1-Domäne, die eine Bindungsstelle für Hepatozyten aufweist, sowie auch großen Teilen der PräS2-Domäne.

Im Folgenden wurde untersucht, wie sich das Bindungsverhalten trypsinierter bzw. V8-verdauter HBs-Sphären an Tupaiahepatozyten darstellt. Hierfür standen SVP zur Verfügung, die partiell mit Trypsin bzw. der Protease V8 verdaut worden waren, und damit aus (glykosyliertem) SHBs plus einem kurzen PräS2-Fragment bestanden.

Primäre Tupaiahepatozyten wurden auf collagenisierten Deckgläschen für 1 h bei 37°C mit jeweils 400ng Trypsin- bzw. V8-verdauter Sphären inkubiert, anschließend gründlich mit Medium gewaschen, fixiert und immunzytochemisch zum HBsAg-Nachweis aufgearbeitet.

Hierbei zeigte sich, daß beide Arten der unterschiedlich proteolytisch prozessierten Sphären gebunden bzw. aufgenommen werden (Abb. 3-4.11). Bezüglich der Intensität zeigte sich (in parallel durchgeführten Versuchsansätzen) kein erkennbarer Unterschied zur Bindung und Aufnahme nativer SVP.

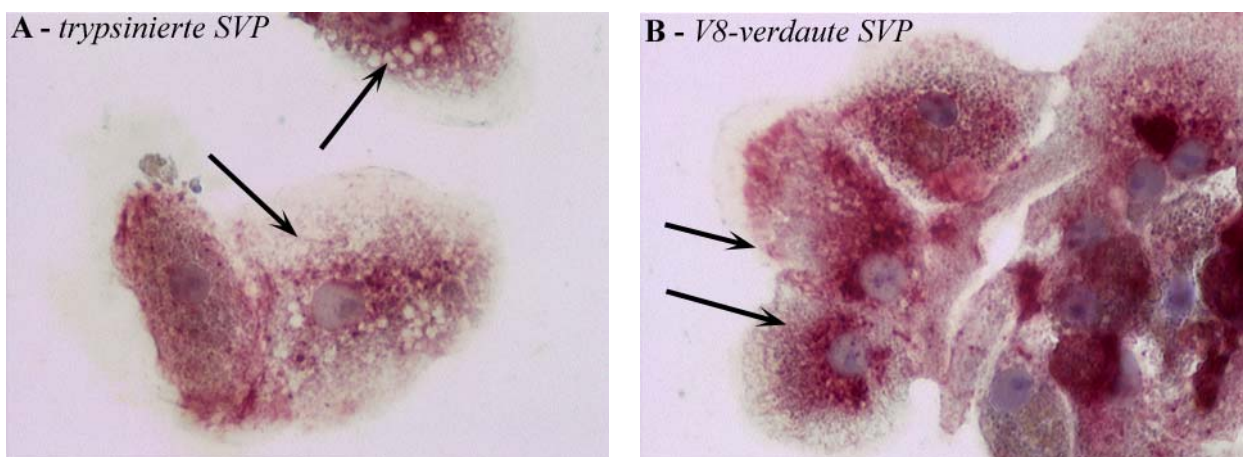


Abb. 3-4.11: Bindung und Aufnahme proteolytisch verdauter SVP durch primäre Tupaiahepatozyten. Immunzytochemischer Nachweis von HBsAg (rot). Sowohl Trypsin- (A) als auch V8-verdaute SVP (B) werden durch die Tupaiahepatozyten gebunden und aufgenommen (Pfeile). Gegenfärbung mit Hämalaun (blau), Mikroskopvergrößerung 200x. In der Negativkontrolle war kein zellassoziiertes HBsAg nachweisbar (hier nicht abgebildet).

3.4.1.8 Bindung / Aufnahme von nicht-nativem (modifiziertem) HBsAg - desialylierte trypsinierte subvirale Partikel

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob sich das Bindungsverhalten trypsinierter SVP ändert, wenn sie zudem desialyliert sind (die S-Domäne ist normalerweise an Asparagin-146 *N*-glykosyliert). Dazu wurden primäre Tupaiahepatozyten nach üblichem Procedere mit 600 ng desialylierter trypsinierter SVP pro Präparat inkubiert und immunzytochemisch aufgearbeitet. Auch in diesen Präparaten war eine Bindung und Aufnahme der SVP deutlich nachweisbar (Abb. 3-4.12 A). Ebenso wie bei intakten desialylierten SVP (vgl. Kap. 3.4.1.6) konnte die Bindung dieser SVP nicht durch einen Überschuß an lactosyliertem Protein inhibiert werden (Präinkubation mit 12 µg lactosyliertem Albumin, Inkubation mit 600 ng desialylierter trypsinierter SVP + 12 µg lactosyliertem Albumin, Abb. 3-4.12 B).

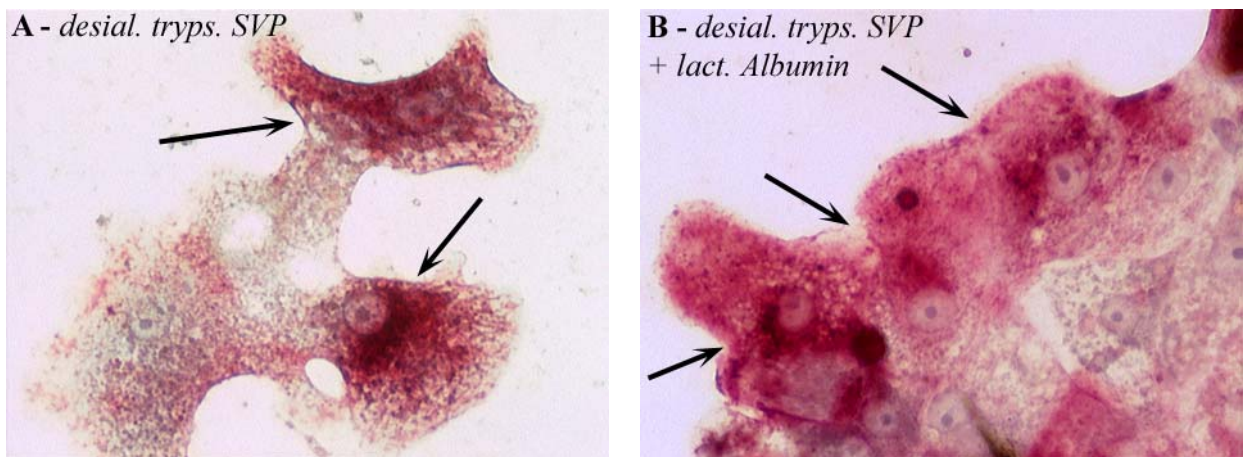


Abb. 3-4.12: Bindung und Aufnahme von desialylierten trypsinisierten SVP durch primäre Tupaiahepatozyten. Immunzytochemischer Nachweis von HBsAg (rot).

A: In Tupaiahepatozyten, die mit desialylierten trypsinisierten SVP inkubiert wurden, ist HBsAg deutlich nachweisbar (Pfeile).

In der Negativkontrolle war kein HBsAg nachzuweisen (keine Abb.).

B: Die Aufnahme der desialylierten trypsinisierten SVP ist durch einen Überschuß an kompetitivem Inhibitor des Asialoglykoproteinrezeptors (lactosyliertes Albumin) nicht inhibierbar.

Schwache Gegenfärbung mit Hämalaun (blau), Mikroskopvergrößerung 200x.

3.4.1.9 Intrazelluläre Verteilungsmuster der unterschiedlichen SVP

Unabhängig von der Art der SVP war prinzipiell in ein und demselben Präparat in der Regel ein Nebeneinander verschiedener Verteilungsmuster zu beobachten.

Betrachtete man die räumliche Verteilung der unterschiedlichen Arten subviraler Partikel in Bezug auf die verschiedenen Bereiche des Zellkörpers jedoch genauer, so zeigten sich tendenzielle qualitative Unterschiede zwischen dem Verteilungsmuster der nativen SVP gegenüber dem modifizierter SVP, vor allem dem der trypsinierten (bzw. V8-verdauten) SVP. Die trypsinierten und V8-verdauten HBs-Sphären stellten sich überwiegend als großes, den Zellkern umschließendes Konglomerat dar, mit unterschiedlich intensiver Anfärbbarkeit im gesamten übrigen Zytoplasma. In der Zellperipherie, vor allem aber direkt subplasmalemmal, ließen sie sich nur selten, und dann relativ schwach darstellen. Die nativen Sphären und Filamente hingegen waren vorwiegend direkt am Plasmalemm nachweisbar, oder diffus im gesamten Zytoplasma verteilt, und weniger häufig als größeres Konglomerat in zentralen, direkt perinukleären Zellregionen (Abb. 3-4.13; vgl. auch Abb. 3-4.1 und 3-4.10).

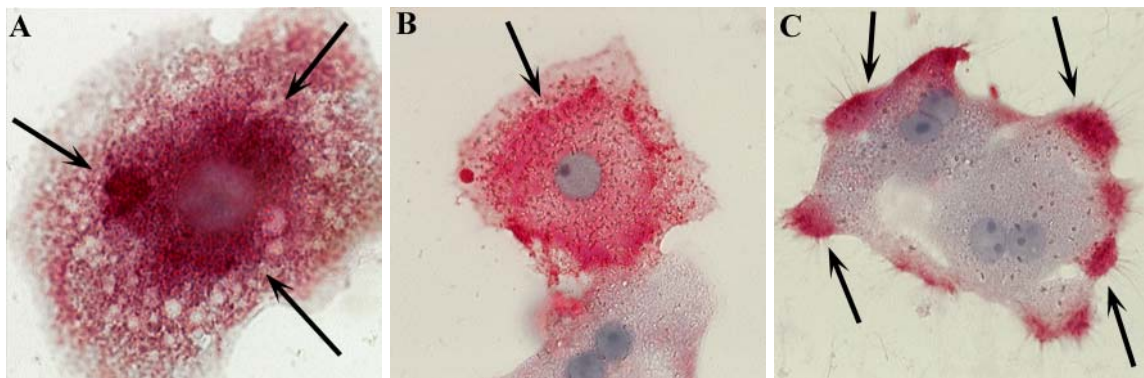


Abb. 3-4.13: Unterschiedliche Verteilungsmuster von HBsAg (rot) in primären Tupaiahepatozyten nach Inkubation mit verschiedenen subviralen Partikeln.

A: Große perinukleäre Ansammlung von HBsAg (Pfeile), wie sie vor allem nach Inkubation mit trypsinierten oder V8-verdauten SVP beobachtet wird.

B: „Intermediärer“ Verteilungstyp nach Inkubation mit nativen SVP (hier: Filamente); das HBsAg ist weder in direkter Nähe der Plasmamembran, noch streng perinukleär lokalisiert, sondern relativ diffus im gesamten Zytoplasma (Pfeil).

C: Nachweis des HBsAg ganz überwiegend direkt an der Plasmamembran (Pfeile); dieses Verteilungsmuster tritt ganz überwiegend bei Inkubation mit nativem HBsAg (hier: Filamente) auf.

Immunzytochemischer Nachweis von HBsAg (rot).

Gegenfärbung mit Hämalaun (blau); Mikroskopvergrößerung 400x.

3.4.2. Bindung und Aufnahme von HBsAg durch HepG2-Zellen

Von HepG2-Zellen wurde berichtet, daß sie zwar nicht infizierbar sind, aber dennoch Hepatitis B-Viren binden und aufnehmen können (u.a. NEURATH *et al.* 1986b, QIAO *et al.* 1994, TREICHEL *et al.* 1997). Im Folgenden wurde untersucht, ob sich immunzytochemisch Unterschiede zwischen primären Tupaiahepatozyten und HepG2-Zellen in der Aufnahme nativer subviraler Partikel darstellen lassen.

HepG2-Zellen wurden auf collagenisierten Deckgläschen in DMEM + 1% DMSO kultiviert; wie bei HepG2.2.15-Zellen konnte auch hier kein Medium mit 2% DMSO verwendet werden, da die Zellen sonst starben (vgl. Kap. 3.3.2). Nach zwei Tagen Kultivierung wurden die Deckgläschen für eine Stunde bei 37°C mit jeweils 40 µl SVP-haltigem Medium inkubiert. Dem Inkubationsmedium aus DMEM mit einem Prozent bovinem Serumalbumin (BSA) wurden jeweils 400 ng HBs-Filamente bzw. HBs-Sphären zugefügt. Nach Inkubationsende wurden die Präparate gründlich gewaschen, sofort fixiert, permeabilisiert, und dem immunzytochemischen HBsAg-Nachweis zugeführt.

Dabei zeigte sich in den mit SVP inkubierten HepG2-Zellen eine deutliche Anfärbung von HBsAg im Zytoplasma, vor allem in der Umgebung des Zellkerns. Dies stellte sich sowohl nach Inkubation mit Filamenten, als auch mit Sphären gleichermaßen dar. Über 95% der Zellen waren HBsAg-positiv (Abb. 3-4.14).

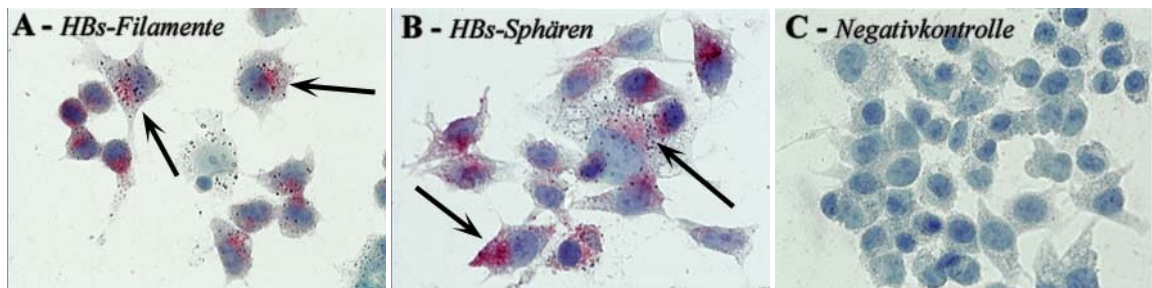


Abb. 3-4.14: Immunzytochemischer Nachweis von HBsAg (rot) in HepG2-Zellen nach Inkubation mit SVP-haltigem Medium, 1h bei 37°C. Deutliche Ansammlungen im Bereich der Zellkerne (Pfeile).

A: Inkubation mit 400 ng HBs-Filamenten; **B:** Inkubation mit 400 ng HBs-Sphären; **C:** Negativkontrolle

Gegenfärbung mit Hämalaun (blau); Mikroskopvergrößerung 400x.

Um zu untersuchen, ob die Bindung bzw. Aufnahme subviraler Partikel durch HepG2-Zellen inhibierbar ist, wurde SVP-haltiges Inkubationsmedium (400 ng HBs-Sphären) mit 7,5 µg polyklonalem Anti-HBs-Antikörper zunächst für 30 min. bei Raumtemperatur präinkubiert, danach für 1h bei 37°C auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Präparate mit Zellkulturmedium gewaschen und fixiert. In diesen Präparaten blieb der immunzytochemische Nachweis von HBsAg negativ (Abb. 3-4.15).

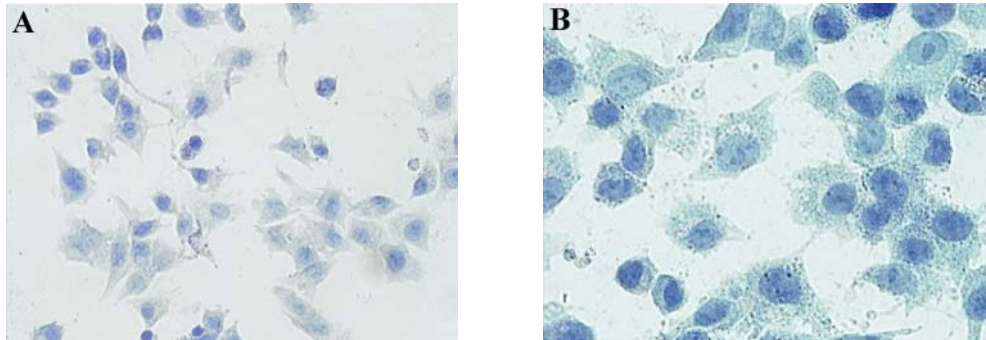


Abb. 3-4.15: Inhibition der Bindung / Aufnahme von HBsAg durch HepG2-Zellen durch Präinkubation des Inkubationsmediums mit einem polyklonalen Anti-HBs-Antikörper. HBsAg (rot) ist immunzytochemisch nicht nachweisbar. Gegenfärbung mit Hämalaun (blau); Mikroskopvergrößerung 200x (A) bzw. 400x (B).

4. Diskussion

4.1. Isolation und Kryopräservation primärer Hepatozyten

Das zentrale Thema dieser Arbeit war die Interaktion des humanen Hepatitis B-Virus mit Hepatozyten, mit dem Ziel, die frühen Phasen des Lebenszyklus dieses Virus näher charakterisieren zu können. Als entscheidende Voraussetzung hierfür mußten zunächst die Methoden zur Gewinnung geeigneter Hepatozyten revidiert, und wesentlich verbessert werden. Der überwiegende Teil der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnte nur mit primären Tupaiahepatozyten durchgeführt werden, da eine Suszeptibilität der verfügbaren Hepatomzelllinien für eine HBV-Infektion zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte. Eine Ausnahme bildete die Zelllinie HepaRG (Gripon *et al.* 2002), die jedoch nicht zur Verfügung stand. Auch primäre humane Hepatozyten standen nicht zur Verfügung; die Gewinnung dieser Zellen ist generell sehr schwierig, weil es keine ethische Rechtfertigung dafür gibt, einem Menschen gesundes Lebergewebe zu experimentellen Zwecken zu entnehmen, da ein solcher Eingriff mit hohen Risiken verbunden ist (z.B. schwere Blutungen). Die einzige verfügbare und geeignete Quelle für primäre humane Hepatozyten ist Resektionsmaterial, welches bei einer Leberoperation ohnehin anfällt. Hierbei ist das Lebergewebe jedoch in der Regel pathologisch verändert, und die Hepatozyten sind meistens von minderer Qualität, was die Nutzbarkeit dieser Zellen einschränkt.

Die Verfügbarkeit primärer Tupaiahepatozyten ist vor allem abhängig von der Verfügbarkeit geeigneter Tupaias und dem Erfolg der Zellisolation aus dem Organ. Anders als in den ostasiatischen Heimatländern der Tupaias, ist hierzulande die Verfügbarkeit der in Gefangenschaft schwierig zu züchtenden Tiere auf einige wenige Tupaiazuchten begrenzt. Die Möglichkeit zur Kryopräservation isolierter Zellen ermöglicht ein höheres Maß an Flexibilität bei der Versuchsplanung, weil die Verfügbarkeit der Zellen dann erstens nicht direkt von der Verfügbarkeit eines Tupaias abhängig ist, und zweitens nicht auf eine kurze Zeitperiode direkt nach der Isolation beschränkt bleibt.

4.1.1 Isolation

Die originär von SEGLEN (1976) beschriebene Methode zur Isolation primärer Hepatozyten mittels Zwei-Schritt-Collagenaseperfusion wurde vor allem für die Anwendung an der Ratte weiter modifiziert und etabliert (u.a. BERRY *et al.* 1991). Für die Anwendung bei Tupaia erwies sich die bei BERRY *et al.* beschriebene Technik prinzipiell als geeignet, jedoch war sie noch verbesserungsfähig. Als einflußreichster Faktor in Hinblick auf die Zellausbeute erwies sich die Volumenflußrate, mit der die Leber perfundiert wurde, und damit verbunden auch der intrahepatische Druck während der Perfusion sowie die Perfusionsdauer. Alle diese Faktoren stehen untereinander in Wechselwirkung, wobei der intrahepatische Druck stark mit dem Pfortaderdruck korreliert (SAITO *et al.* 1987). Unter den anfänglichen Bedingungen (Perfusion des Organs *in situ* mit 25 ml/min), mit einer Flußrate weit über physiologischen Verhältnissen, und einem hohen posthepatischen Widerstand, stand die Leberkapsel deutlich unter Spannung, und riß schon nach insgesamt ca. 40 - 45 min. Perfusion ein. Wird die Leber mit einem hohen Druck perfundiert, wie es anfangs der Fall war, könnte die Organkapsel auf Grund der hohen Spannung schon dann einreißen, wenn sich viele Zellen noch nicht ausreichend aus dem Gewebeverband gelöst haben.

Durch die Reduktion der Volumenflußrate um mehr als 60% auf 8 - 10 ml/min sowie der Senkung des posthepatischen Widerstandes wurde die Organspannung der Leber deutlich vermindert, so daß das Organ erst nach insgesamt ca. 70 min. ausreichend aufgeweicht war. Wegen des länger dauernden Calciumentzugs, der zum Verlust der Zell-Zell-Kontakte führt, sowie der längeren Einwirkungszeit der Collagenase, ist es wahrscheinlich, daß sich mehr Zellen aus dem Parenchymverband lösen können als bei kürzeren Perfusionszeiten. Die Zellausbeute steigt dadurch.

Die so veränderten Perfusionsbedingungen hatten auch eine höhere Viabilität der Zellen zur Folge. Dies könnte dadurch zu erklären sein, daß die Zellen bei einem höheren Perfusionsdruck einem höheren mechanischen Streß ausgesetzt sind, der Zellschädigungen bis hin zur Nekrose verursachen kann. Daß ein akut erhöhter Pfortaderdruck zu Leberzellnekrosen führt, wurde unter anderem schon früher beschrieben (KOYAMA *et al.* 2003, IWAI *et al.* 1998).

Eine weitere Steigerung der Zellviabilität konnte dadurch erreicht werden, daß an Stelle einer kalten calciumfreien Lösung eine oxygenierte, raumtemperierte verwendet wurde. Diesbezüglich beschreiben BERRY *et al.* (1991), primär im Zusammenhang mit dem Waschen der isolierten Zellen im Anschluß an die Leberperfusion, folgende

Zusammenhänge: Die Verwendung warmer Lösungen verursacht einen größeren zellulären ATP-Verlust und Proteinverlust durch Membranschädigungen, und hat eine reduzierte Syntheseleistung der kultivierten Zellen zur Folge. Durch kalte Lösungen hingegen werden transmembranäre Ionenverschiebungen mit konsekutivem Zellödem verursacht, wodurch die Hepatozyten ebenfalls geschädigt werden können.

Der Einsatz von raumtemperiertem calciumfreien Medium bei der Perfusion unter den modifizierten Bedingungen erwies sich hinsichtlich der Viabilität primärer Tupaiahepatozyten als leicht überlegen gegenüber kalter Lösung. Die Ursache hierfür könnte darin liegen, daß das bei niedrigerer Temperatur entstehende Zellödem im Rahmen der prolongierten Perfusionsphase so schwerwiegend wird, daß es die Zellen stärker schädigt als diejenigen Veränderungen, welche die Zellen bei Raumtemperatur erfahren.

Die unterschiedlichen Auswirkungen verschiedener Collagenase-Präparationen auf Zellausbeute und Viabilität liegt darin begründet, daß dies Substanzgemische sind, die neben Collagenase auch Fremdenzyme in wechselnden Mengen beinhalten (vgl. auch BERRY *et al.* 1991). Die quantitative Zusammensetzung dieses Enzymgemisches ist in unterschiedlichen Produkten, ja sogar in unterschiedlichen Chargen eines Produktes, mehr oder weniger different, da die Produkte aus einem biologischen System (Bakterienkulturen) gewonnen werden.

4.1.2 Kryopräservation

Bei der Forschung mit primären Tupaiahepatozyten bietet die Möglichkeit der Kryopräservation dieser Zellen mehrere wesentliche Vorteile, und bedingt eine große Arbeitserleichterung: Die Verfügbarkeit der Zellen ist dann nicht mehr davon abhängig, daß jedesmal direkt vor der Arbeit mit ihnen ein Tier getötet und die Zellen isoliert werden müssen. Nun können in einem separaten Arbeitsschritt die Zellen gewonnen und portioniert eingefroren werden, um sie zu mehreren beliebig wählbaren Zeitpunkten auftauen und verwenden zu können. Da sich die primären Hepatozyten in der Kultur kaum noch vermehren, ist es nicht möglich, sie in der Kultur in ausreichender Menge anzuzüchten, wie dies bei Hepatomzelllinien geschieht. Die Kryopräservation ermöglicht ein hohes Maß an Flexibilität bei der Versuchsplanung hinsichtlich Zeitpunkt und Umfang der Versuche. Auch kleinere Zwischenversuche, bei denen nur wenige Zellen benötigt werden, können zu beliebigen Zeitpunkten durchgeführt werden, ohne daß extra dafür ein Tier getötet werden muß. Außerdem ist die Verfügbarkeit von Zellen

nicht mehr direkt von der Verfügbarkeit von Tupaia abhängig. Sind diese schwer zu züchtenden und in Mitteleuropa nur sehr begrenzt vorhandenen Tiere für eine längere Zeit nicht verfügbar, so kann ein Vorrat eingefrorener Zellen einen solchen Versorgungsengpaß überbrücken.

Während die Kryopräservierung von Zelllinien eine weit verbreitete und unproblematische Methode ist, ist sie bei primären Zellen auf Grund der Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber den bei dieser Prozedur stattfindenden physikalischen und physikochemischen Veränderungen mit einem höheren Schwierigkeitsgrad behaftet. Das wohl größte Problem beim Einfrieren stellt die intrazelluläre Eiskristallbildung dar, die zu Zellnekrosen führt. Weitere Zellverluste sind der Apoptose, der einige Zellen nach dem Auftauen anheimfallen, zuzuschreiben. Sowohl bei der Einleitung der Apoptose, als auch der Entstehung von Zellnekrosen wirken mehrere zellschädigende Faktoren zusammen, unter anderem folgende: Eine weitreichende Störung von Membranintegrität und -funktionen mit transmembranären Ionenbewegungen, Verlust des zytoprotektiven Antioxidantiums Glutathion und anderer Stoffwechselmetaboliten aus dem Zytoplasma, sowie eine allgemein reduzierte Syntheseleistung der aufgetauten Zellen. (HARRIS *et al.* 1991, FU *et al.* 2001, RODRIGUEZ *et al.* 1998, DE LOECKER *et al.* 1990).

Im Falle primärer Hepatozyten können die so entstehenden Zellverluste auf Grund der stark eingeschränkten Proliferationskapazität der verbleibenden Zellen nicht kompensiert werden. Dies unterscheidet sie ganz wesentlich von Hepatomzelllinien, die nach dem Auftauen stark proliferieren können. Ziel einer optimalen Kryopräservierungsmethode für primäre Hepatozyten muß es daher sein, eine möglichst hohe Wiedererlangung („*recovery*“) lebendiger Zellen nach dem Auftauen zu erreichen. Eine entscheidende Rolle spielt hierbei die Zusammensetzung des Einfriermediums. Für das hier etablierte Protokoll zur Kryopräservierung primärer Tupaiahepatozyten wurde als Basismedium eine modifizierte „*University of Wisconsin solution*“ (UW-Lösung) benutzt. UW-Lösung wurde ursprünglich für die kühle Aufbewahrung von Geweben in der Transplantationsmedizin entwickelt, findet nun aber auch zunehmend Verwendung für die Kryopräservierung von Zellen. UW-Lösung wirkt auf vielerlei Art und Weise zytoprotektiv, unter anderem durch Stabilisierung der Zellmembran, Verhinderung von transmembranären Ionenbewegungen, von Zellödem und intrazellulärer Azidose, sowie Reduktion oxidativer Schädigungen; weiterhin inhibiert sie Mechanismen zur Einleitung der Apoptose (ARIKURA *et al.* 2002).

Das in dieser Arbeit etablierte Protokoll zur Kryopräservierung primärer Tupaiahepatozyten ermöglicht das Einfrieren und Auftauen dieser Zellen mit einer hohen Wiedererlangungsrate („*recovery-Rate*“). Diese Rate ist bei Verwendung von UW-Lösung anstelle von DMEM als Basismedium deutlich höher, was die Überlegenheit von UW-Lösung gegenüber normalem Zellkulturmedium hinsichtlich seiner zytoprotektiven Eigenschaften zeigt. Auch erwiesen sich die eingesetzten Konzentrationen von DMSO und FKS, sowie die Anwendung einer Mehrschritt-Technik beim Auftauen als sehr gut geeignet. Die erzielten Ergebnisse stimmen mit denen überein, die DANDRI *et al.* (2001 u. 2005) in ihren Studien zur Kryopräservierung primärer Waldmurmeltier- und Tupaiahepatozyten erhalten haben.

Die aufgetauten Zellen wiesen im Vergleich zu frisch isolierten in der ersten Zeit der Kultivierung keine lichtmikroskopisch erkennbaren morphologischen Unterschiede auf (Abb. 3-1.3), was darauf schließen läßt, daß sich die Kryopräservierung kaum auf ihren Differenzierungszustand und damit diverse Zellfunktionen auswirkt. Genauere Aussagen hierzu ließen sich beispielsweise durch die Untersuchung zellulärer Stoffwechselleistungen oder des mRNA-Expressionsmusters treffen. Auch ARIKURA *et al.* (2002) stellten die morphologische Gleichheit zwischen frisch isolierten und aufgetauten primären (Ratten-)Hepatozyten fest, aber nur dann, wenn sie unter Verwendung von UW-Lösung kryopräserviert wurden. Bei DMEM als Basiskomponente des Gefriermediums fanden sie nicht nur größere morphologische Unterschiede, sondern auch eine deutlich stärkere Schädigung der hepatozytären Zellmembran sowie eine reduzierte Stoffwechselaktivität im Vergleich zu denjenigen Zellen, die mit UW-Lösung eingefroren wurden. Demnach ist zu erwarten, daß sich mit UW-Lösung kryopräservierte primäre Tupaiahepatozyten nach dem Auftauen in einem Differenzierungszustand befinden, der demjenigen frisch isolierter Zellen sehr ähnlich ist, und nur sehr leichte zelluläre Schäden aufweisen.

Wie eine Studie von CHESNE *et al.* (1993) zeigt, unterscheidet sich der Stoffwechsel kryopräservierter Zellen anfangs noch von dem frisch isolierter Zellen, gleicht sich aber nach 24 - 48 Stunden Kultivierung an. Aus diesem Grund wurden die meisten Versuche mit den primären Tupaiahepatozyten nach zwei bis drei Tagen Latenz nach der Isolation bzw. nach dem Auftauen durchgeführt.

Durch die Zugabe von Polyethylenglykol (PEG) zu UW-Lösung können Leberzellen noch effektiver vor einer Schädigung durch Kälteeinwirkung geschützt werden (MACK *et al.* 1991, BEN ABDENNEBI *et al.* 2002). Welche Mechanismen dabei eine Rolle spielen, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Angenommen werden unter anderem ein Schutz des Zytoskeletts vor einem Kälteschaden, sowie die Wirkung von PEG als intrazelluläres Antioxidantium, welches insbesondere vor dem oxidativen Streß beim Auftauvorgang schützt.

Als Zusätze zu diesem Basismedium aus PEG-versetzter UW-Lösung wurde einerseits Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet, das vor allem die zellschädigende intrazelluläre Eiskristallbildung reduziert (HARRIS *et al.* 1991), andererseits fetales Kälberserum (FKS). Die Mechanismen, über die FKS die Zellen beim Einfrieren schützt, sind nicht genau bekannt; diskutiert werden unter anderem eine Stabilisierung der Zellmembran, Schutz vor osmotischem Streß durch die Versorgung mit bestimmten Aminosäuren, und / oder eine Unterstützung zellulärer Reparaturmechanismen (LEONI *et al.* 2002).

Abb. 4-1.1 gibt eine vereinfachte Übersicht über die Mechanismen der Zellschädigung beim Einfrieren und Auftauen isolierter Zellen, die durch die Verwendung eines geeigneten Kryopräservationsmediums, wie dem hier verwendeten, minimiert werden können.

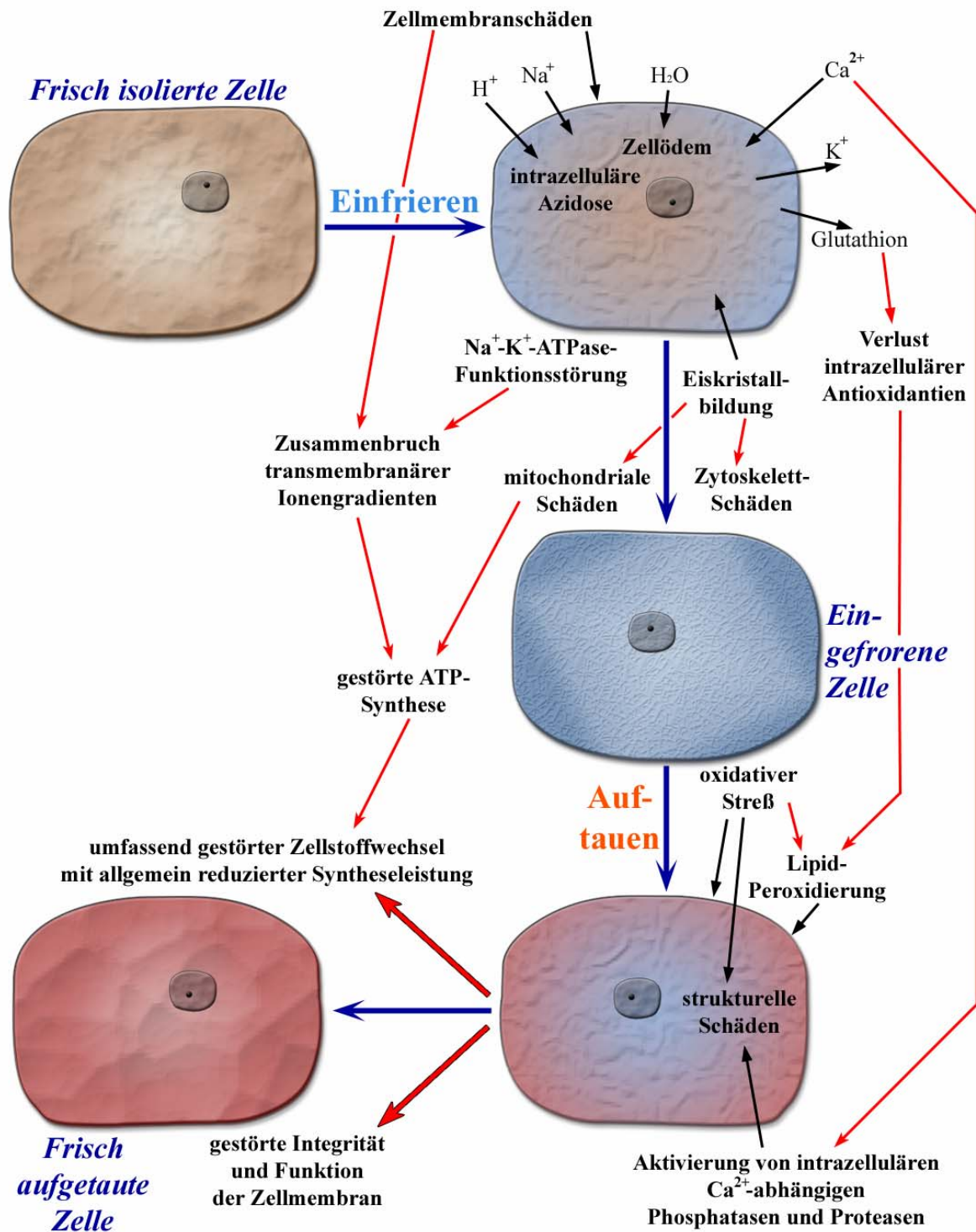


Abb. 4-1.1: Schematische, stark vereinfachte Darstellung einiger Mechanismen, die im Rahmen eines Einfrier-Auftau-Zyklus zur Schädigung primärer Zellen führen können. Dargestellt sind die direkten Einwirkungen auf die Zelle (schwarze Pfeile), sowie deren Folgen und übergeordnete Zusammenhänge (rote Pfeile).

4.2 Proteinexpression und funktionelle Differenzierung primärer Hepatozyten

Der Differenzierungszustand primärer Hepatozyten zeigt sich in der Expression spezieller Proteine, insbesondere Enzyme, Rezeptoren und Zytoskelettkomponenten. Teilweise erlaubt schon der qualitative Nachweis charakteristischer Proteine Rückschlüsse auf die Zelldifferenzierung.

4.2.1 Expression von Zytoskelettfilamenten

a) **Tubulin.** Der positive Nachweis von acetyliertem α -Tubulin in primären Tupaiahepatozyten entsprach den Erwartungen, da Tubulin in dieser Form in sehr vielen Säugetierzellen vorkommt. Nur in wenigen Zellen, zum Beispiel der Rattenkänguruh-Zelllinie PtK2, liegt das erkannte Epitop in einer nicht-acetylierten oder anderweitig modifizierten Form vor (PIPERNO *et al.* 1987), und ist damit mit dem verwendeten Antikörper nicht direkt nachweisbar. Die Nachweisbarkeit von Tubulin in Tupaiahepatozyten erlaubt beispielsweise Untersuchungen zur Interaktion des Hepatitis B-Virus mit Tubulin-abhängigen intrazellulären Transportsystemen.

b) **Vimentin.** Für differenzierte Hepatozyten in einer gesunden Säugetierleber sind vor allem die Zytokeratine (CK) CK8 und CK18 charakteristisch. Eine Expression von Vimentin findet in diesen Zellen nicht statt, wohl aber in sogenannten „duktulären Hepatozyten“ („*ductular hepatocytes*“), die den Ausgangspunkt für die Leberzellregeneration nach größeren Organnekrosen bilden, und damit eine Art hepatische Stammzellen darstellen (SHIGA und SHIROTA 2000). Auch bestimmte Populationen hepatischer Gallengangsepithelzellen und Fibroblasten produzieren physiologischerweise Vimentin (u.a. HERBST *et al.* 1997, ALISON *et al.* 1997, HAQUE *et al.* 1996). Eine *de novo*-Synthese von Vimentin in Hepatozyten *in vivo* findet nur bei bestimmten Lebererkrankungen statt, ebenso die *de novo*-Synthese von CK7 und CK19, sowie eine erhöhte Produktion von CK8 und CK18. Die erhöhte Filamentsynthese steht dabei in einem inversen Verhältnis zur Expression leberzellspezifischer Proteine (BLAHETA *et al.* 1998, BEN-ZE'EV *et al.* 1988), und indiziert einem geringeren Differenzierungszustand, ebenso das Vorhandensein von Vimentinfilamenten.

In dieser Arbeit konnten durch den Nachweis von Vimentin in bestimmten Hepatozytenpopulationen der Zellkultur Rückschlüsse auf den Differenzierungszustand der verschiedenen Zellen gezogen werden. Es konnte nur in solchen Zellen

nachgewiesen werden, die am Rande eines größeren Zellverbandes lagen, oder aber in solitär liegenden. Diejenigen Zellen, die inmitten eines größeren Zellverbundes lagen, zeigten keine Expression von Vimentin. Es ist daher anzunehmen, daß sie ähnlich differenziert waren wie Hepatozyten in normalem Lebergewebe *in vivo*, da dort auch keine Vimentinexpression stattfindet.

Ebenso wie *in vivo*, findet auch unter *in vitro*-Bedingungen die hepatozelluläre Vimentinproduktion in Abhängigkeit vom Differenzierungszustand der Zellen statt. Dieser wird hier vor allem von Zell-Zell-Kontakten, der Art der Zellkulturmatrix und dem Zellkulturmedium bestimmt, und ändert sich mit zunehmender Kultivierungsdauer in Richtung Dedifferenzierung (SCHUETZ *et al.* 1988, KARAVANOVA *et al.* 1985, PAGAN *et al.* 1997, BLAHETA *et al.* 1998). Die Beobachtung, daß es sich bei Kultivierung auf einer Collagenmatrix nur in Zellen nachweisen ließ, die entweder solitär oder in der Peripherie eines Zellverbandes lagen, stimmt mit den Berichten anderer Autoren überein (BLAHETA *et al.* 1998, PAGAN *et al.* 1997).

Hieraus, und aus der unterschiedlichen Struktur des Filamentnetzwerkes in solitären und randständigen Hepatozyten, kann man ableiten, daß die Zelldifferenzierung vom Vorhandensein und von der Ausprägung von Zell-Zell-Kontakten in sehr diffiziler Weise beeinflußt wird. Dies mag eine entscheidende Rolle für die Suszeptibilität von primären Tupaiahepatozyten für eine HBV-Infektion spielen, da sich infizierte Zellen bislang nur mitten in einem Zellverband nachweisen ließen, nie jedoch in randständigen oder solitären Zellen. Hierauf wird im weiteren Verlauf der Diskussion nochmals eingegangen werden.

Weitergehende Aussagen zur Differenzierung der kultivierten Hepatozyten wären beispielsweise durch den Nachweis der Zytokeratine CK7, 8, 18 und 19 möglich, die unter unterschiedlichen Bedingungen in charakteristischer Art und Weise exprimiert werden (BLAHETA *et al.* 1998).

Aus den getroffenen Beobachtungen kann man die Forderung ableiten, in der Zellkultur einen möglichst geschlossenen Zellverband zu erreichen, da dies für den Differenzierungszustand der Zellen optimal wäre, und damit eine bessere Vergleichbarkeit mit der Situation *in vivo* möglich ist.

Im Weiteren wäre die Untersuchung der Zelldifferenzierung bei Verwendung anderer extrazellulärer Matrices, z.B. Laminin oder Matrigel statt Collagen Typ I, interessant, da nach BLAHETA *et al.* (1998) besonders diese beiden Matrices die Dedifferenzierung kultivierter Hepatozyten verzögern können.

4.2.2 Funktionalität von Oberflächenrezeptoren

a) Asialoglykoproteinrezeptor (ASGPR). Der Asialoglykoproteinrezeptor konnte auf primären Tupaiahepatozyten mittels indirekter Immunfluoreszenz oder Immunzytochemie unter Verwendung eines Antikörpers gegen den humanen ASGPR nicht dargestellt werden.

Jedoch war es möglich, eine Aufnahme von lactosyliertem, FITC-markiertem Human-Albumin durch die Tupaiahepatozyten nachzuweisen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß diese Zellen unter den gegebenen Kulturbedingungen über einen funktionstüchtigen ASGPR verfügen, dieser jedoch nicht vom verwendeten Antikörper gegen den humanen ASGPR erkannt wird.

Der Asialoglykoproteinrezeptor wird ausschließlich von Hepatozyten exprimiert, und dort nur in bestimmten Arealen der Zytoplasmamembran: Er kommt in einer hohen Dichte auf der sinusoidalen (basolateralen) Zellmembran vor, welche im Gewebeverband der Leber mit den Kapillaren in Kontakt steht, und über welche ein reger Stoffaustausch mit dem Blutplasma stattfindet. Auf der apikalen (den Gallenkanälchen zugewandten) Zellmembran fehlt der ASGPR hingegen (vgl. SPIESS 1990). Das Vorkommen des ASGPR auf der Zellmembran ist also abhängig von der Spezialisierung bestimmter Abschnitte der Zytoplasmamembran, und folglich vom Differenzierungszustand der Zelle. Eine Bedeutung des ASGPR für die HBV-Infektion bzw. Bindung und Aufnahme der Virionen wurde bereits von mehreren Autoren postuliert (u.a. TREICHEL *et al.* 1994 u. 1997, vgl. auch DE MEYER *et al.* 1997). Aus Studien mit Sendai-Viren ist bekannt, daß diese bei Verlust ihres originären Bindeproteins über den ASGPR von Leberzellen aufgenommen werden, und diese auf diesen Weg infizieren können (MARKWELL *et al.* 1985). Auch das Marburg-Virus, ein Filovirus, kann über den ASGPR Hepatozyten und HepG2-Zellen infizieren (BECKER *et al.* 1995).

Weiterhin scheinen Autoantikörper gegen den ASGPR im Rahmen der Infektion von Waldmurmeltieren mit dem *Woodchuck* Hepatitis Virus (WHV) eine Rolle bei der Pathogenese der hepatischen Entzündungsreaktion zu spielen (DIAO *et al.* 1998).

Bei den hier durchgeführten Experimenten schienen nicht alle kultivierten Tupaiahepatozyten den ASGPR gleich stark zu exprimieren, vielmehr war auch hier die Expression offensichtlich vom Differenzierungszustand der Zellen abhängig. Nur diejenigen Hepatozyten, die als Zeichen einer höheren Differenzierung wenig Vimentin exprimierten, nahmen nachweisbare Mengen lactosylierten Albumins auf, während die

geringer differenzierten Zellen mit hoher Vimentinexpression keine darstellbare Aufnahme von lactosyliertem Albumin zeigten.

Die nicht-parenchymatischen Zellen aus der Tupaialeber, die sich in kleinen Mengen in der Hepatozytenkultur befanden, zeigten keinerlei Bindung oder Aufnahme des lactosylierten FITC-Albumins. Dies spricht gegen eine unspezifische Bindung dieses synthetischen Asialoglykoproteins an die kultivierten Zellen.

b) Transferrinrezeptor. Der Transferrinrezeptor (CD71) wird *in vivo* unter anderem von Hepatozyten und hepatischen KUPFFER-Zellen exprimiert, sowie in einigen extrahepatischen Geweben, wie zum Beispiel der Hypophyse (GATTER *et al.* 1983). Die Expression dieses Rezeptors auch *in vitro* konnte unter anderem an primären Rattenhepatozyten und HepG2-Zellen gezeigt werden (THORSTENSEN u. ROMSLO 1984, HIRSH *et al.* 2002). In dieser Arbeit konnte eine Aufnahme von humanem Transferrin durch primäre Tupaiahepatozyten fluoreszenzmikroskopisch nicht nachgewiesen werden. Dafür kann es verschiedene Gründe geben: Einerseits ist die Transferrinaufnahme in einem gewissen Maß speziesspezifisch. So konnte MORGAN (1991) zeigen, daß Rattenhepatozyten zwar Transferrin von Ratte, Mensch, Hund und Kaninchen aufnehmen, nicht aber welches von Kurzschwanzkängurus und niederen Vertebraten wie Fischen, Reptilien und Amphibien. Verantwortlich ist hierfür eine hochspezifische Interaktion zwischen dem Transferrinrezeptor und seinem Liganden, dem Transferrin.

Andererseits wird der Transferrinrezeptor möglicherweise von den Tupaiahepatozyten unter den gegebenen Zellkulturbedingungen gar nicht exprimiert, oder nur in einem so geringen Maß, daß er mit den angewandten Methoden nicht erfaßt werden konnte. Ein Indiz für diese These ist der Umstand, daß der Transferrinrezeptor auch mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie, mit einem Antikörper gegen den humanen Transferrinrezeptor, nicht nachgewiesen werden konnte. Dies wiederum kann aber auch darin begründet liegen, daß der tupaine (Tupaia-) Transferrinrezeptor auf Grund einer abweichenden Aminosäuresequenz oder seiner räumlichen Struktur keine Bindungsstelle für den verwendeten Primärantikörper aufweist.

4.2.3 Vergleichende Gegenüberstellung der eingesetzten immunzytochemischen und immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweismethoden

Die indirekte Immunfluoreszenz ist, vor allem in Kombination mit der konfokalen Laser-scanning Mikroskopie, ein sehr elegantes Verfahren, das durch den geschickten Einsatz unterschiedlicher Fluorophore den spezifischen Nachweis mehrerer zellulärer Antigene gleichzeitig erlaubt. Ein weiterer Vorteil der konfokalen Mikroskopie liegt darin, daß man gezielt eine frei wählbare, wenige Mikrometer dicke Schicht einer Zelle betrachten kann, und nicht alle Ebenen übereinander projiziert sieht, wie in der Auflichtmikroskopie vollständiger Zellen. Dies ermöglicht eine intrazelluläre Lokalisation interessierender komplexer Strukturen. Weiterhin ist die Möglichkeit der virtuellen pseudo-dreidimensionalen Rekonstruktion einer kompletten Zelle gegeben.

Leider war diese Methode für die durchgeführten Experimente jedoch wenig praktikabel, weil die primären Tupaiahepatozyten eine starke Eigenfluoreszenz in praktisch allen Lichtwellenbereichen des eingesetzten Laser-scanning Mikroskops zeigten. Vor allem die Anregung mit monochromatischem blauen Licht ($\lambda=488$ nm) ergab eine intensive Emission von grünem Licht. Dieses Phänomen wird hauptsächlich auf die in der Plasmamembran der Hepatozyten befindlichen Flavine (Riboflavin, FAD, FMN) zurückgeführt (NOKUBO *et al.* 1988).

Diese starke Hintergrundfluoreszenz, die eine schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis bedingte, erforderte die Anwendung einer immunzytochemischen Methode, auch wenn hier eine spezifische simultane Markierung unterschiedlicher Antigene sehr schwierig ist, und nicht die Möglichkeit der konfokalen Mikroskopie besteht.

Bei der angewandten immunzytochemischen Methode nach dem APAAP-Prinzip trat keine unspezifische Hintergrundfärbung auf, außerdem stellte sie sich als sehr sensitiv im Nachweis auch kleinster Mengen HBsAgs dar.

Für die in dieser Arbeit untersuchten Fragestellungen erwies sich diese Methode als sehr gut geeignet. Jedoch wäre es für weitergehende Untersuchungen, beispielsweise zur Interaktion subviraler Partikel mit zellulären Strukturen wie Zytoskelettfilamenten oder Oberflächenrezeptoren, wünschenswert, auf eine praktikable immunfluoreszenzmikroskopische Methode zurückgreifen zu können. In dieser Richtung sollten zukünftig noch weitere Anstrengungen unternommen werden.

4.3 Infektion primärer Tupaiahepatozyten mit dem humanen Hepatitis B-Virus

Die Infizierbarkeit des ostasiatischen Spitzhörnchens *Tupaia belangeri* mit HBV *in vivo* ist seit ca. 1987 bekannt (SU 1987); die *in vitro*-Infektion primärer Tupaiahepatozyten wurde erstmals etwa zehn Jahre später beschrieben (WALTER *et al.* 1996). Seitdem wurden, vor allem in Deutschland und China, zahlreiche weitere Bemühungen unternommen, dieses Infektionssystem weiter zu erforschen und auszubauen. Durch die erfolgreiche Etablierung dieses Systems steht das bislang einzige Kleintiermodell für die HBV-Infektion des Menschen zur Verfügung. An diesem Modell sind erstmals Studien zu allen Abschnitten des viralen Lebenszyklus möglich, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dem *in vitro*-Modell unter Verwendung primärer Tupaiahepatozyten der Vorzug gegeben, da darin die frühen Phasen der HBV-Infektion einfacher, genauer und umfangreicher zu untersuchen sind als in einem *in vivo*-System. Natürlich ist auch aus ethischen und tierschutzrechtlichen Gründen ein solches System eindeutig zu bevorzugen. Experimente *in vivo* sind immer mit einer zusätzlichen Belastung für das Tier verbunden, und wahrscheinlich müßte auch hier das Tier am Ende des Versuches getötet werden, um die Leber adäquat untersuchen zu können. *In vitro* ist mit den Leberzellen eines Tieres die Durchführung zahlreicher unterschiedlicher Experimente möglich, während dafür *in vivo* wesentlich mehr Tiere benötigt würden, da man an einem Tier praktisch immer nur einen Versuch durchführen könnte.

Als Nachweismethode der HBV-Infektion wurde ein immunzytochemisches Verfahren gewählt, da unter anderem untersucht werden sollte, wie viele und welche der Zellen in einer Kultur sich infizieren lassen. Hierfür eignen sich immunzytochemische Methoden optimal. Mit diesem Verfahren konnte nun auch in der Tat neu gebildetes HBsAg in den primären Tupaiahepatozyten nachgewiesen werden. Daß es sich hierbei nur um neu synthetisiertes, und nicht um aus den Inokulat aufgenommenes HBsAg handeln kann, wurde durch die im Kapitel 3.4.1.3 beschriebenen Versuche bestätigt. Danach ist aufgenommenes HBsAg bereits zwei Stunden nach Aufnahme mit dem verwendeten Immunzytochemie-System nicht mehr nachweisbar.

4.3.1 Infektion mit gereinigten HBV-Präparationen

In dieser Arbeit konnte die *in vitro*-Infektion primärer Tupaiahepatozyten mit HBV erstmalig immunzytochemisch dargestellt, und damit direkt visualisiert werden, ohne die Struktur der infizierten Zellen vollständig zu zerstören. Diese Vorgehensweise unterscheidet sich damit ganz wesentlich von allen anderen Methoden, die bislang zum Nachweis einer HBV-Infektion in einem *in vitro*-System herangezogen wurden, wie die quantitativen Bestimmungen von HBs- und HBe-Antigen oder HBV-DNA im Zellkulturüberstand, oder SOUTHERN-Blot-, Northern-Blot- oder PCR-Analysen von Zell-Lysaten (vgl. WALTER *et al.* 1996, KÖCK *et al.* 2001, REN u. NASSAL 2001). Lediglich die *in vivo*-Infektion von Tupaia wurde bislang durch den immunzytochemischen Nachweis intrazellulären HBs- bzw. HBc-Antigens in Leber-Schnittpräparaten dargestellt (YAN *et al.* 1996, WALTER *et al.* 1996).

Durch die Möglichkeit der sicheren Identifikation einzelner infizierter Zellen in dem *in vitro*-System wird einem weiten Spektrum von Untersuchungen an vollständigen Zellen der Weg gebahnt. Dies könnte zum Beispiel die gezielte Analyse ausschließlich infizierter Tupaiahepatozyten sein, bis hin zur Einzelzellanalyse unter Zuhilfenahme von Mikrodissektionstechniken (zu dieser Methode siehe z.B. FINK *et al.* 2000).

Viele der in der Literatur beschriebenen *in vitro*-Infektionen primärer humaner oder tupainer Hepatozyten sowie von HepaRG-Zellen mit HBV fanden unter Verwendung eines Infektionsmediums statt, das Polyethylenglykol (PEG) enthielt (WALTER *et al.* 1996, GRIPON *et al.* 1993 u. 2005, SCHULZE-BERGMANN *et al.* 2003, ENGELKE *et al.* 2006). Es ist bekannt, daß PEG die Fusion von Plasmamembranen begünstigt (vgl. PONTECORVO 1975, ALDWINCKLE *et al.* 1982). Daher wäre es durchaus möglich, daß durch PEG auch die Interaktion des umhüllten Hepatitis B-Virus mit den Hepatozytenmembranen unphysiologisch verändert wird, zum Beispiel in Form einer artifiziellen Membranfusion (vgl. KÖCK *et al.* 2001). Dadurch könnte es zur Infektion unter Umgehung des natürlichen Invasionmechanismus kommen. Dies wird jedoch von einigen Arbeitsgruppen als sehr unwahrscheinlich erachtet, da sich die HBV-Infektion trotz des Vorhandenseins von PEG noch spezifisch inhibieren läßt. PEG bewirke keine qualitative Veränderung der Infektion an sich, sondern nur eine rein quantitative Verbesserung der Infektionseffizienz (GRIPON *et al.* 2005).

Da aber der Invasionsmechanismus von HBV in dieser Arbeit möglichst unverfälscht näher studiert und charakterisiert werden sollte, ist hier auf den Einsatz von PEG bewußt verzichtet worden, auch wenn hierdurch die Infektionseffizienz eventuell hätte gesteigert werden können (vgl. GRIPON *et al.* 1993, GRIPON *et al.* 2005).

Zur Infektion von Tupaiahepatozyten kann man HBV-haltiges menschliches Serum benutzen, vor allem *in vivo* wurde dies schon häufiger durchgeführt (vgl. YAN *et al.* 1996, ZHOU *et al.* 2003, WANG *et al.* 2003, WALTER *et al.* 1996). Jedoch scheint es einen Faktor im menschlichen Serum zu geben, der die Bindung von HBV an Tupaiahepatozyten inhibiert, vor allem unter *in vitro*-Bedingungen. Durch gereinigte Viruspräparationen aus humanem Serum läßt sich dieser inhibitorische Faktor eliminieren (KÖCK *et al.* 2001).

Als Reinigungsverfahren eignen sich die Nycodenz- oder die Sucrosegradientenzentrifugation (GLEBE 2006). Ob eine dieser Methoden der anderen überlegen ist, und ob durch diese Behandlungen die Viruspartikel beeinträchtigt werden, ist nicht genau bekannt. Für diese Arbeit wurden ausschließlich Viruspräparationen benutzt, die durch Sucrose-Gradientenzentrifugation gereinigt wurden.

a) Infektion frisch isolierter Zellen. Die Durchführung von Infektionsversuchen an Tupaiahepatozyten, die erst kurze Zeit vorher aus dem lebenden Tier isoliert wurden, stellte bis zur Anfertigung dieser Arbeit die einzige übliche Vorgehensweise dar.

Um den Zellen nach der Isolation genügend Zeit zur Redifferenzierung zu geben, und einen weitgehenden Austausch der eventuell während der Isolation beschädigten Oberflächenrezeptoren zu gewährleisten, wurden alle hier beschriebenen Infektionsversuche am dritten Tag nach der Zellisolation durchgeführt. Nach Beobachtungen von GLEBE und Mitarbeitern (persönliche Mitteilung) ist die Infektionseffizienz zu diesem Zeitpunkt am größten. Dieses Vorgehen unterscheidet sich von demjenigen anderer Arbeitsgruppen, die bereits nach einem oder zwei Tagen nach der Isolation mit der Infektion beginnen (vgl. WALTER *et al.* 1996, KÖCK *et al.* 2001).

Bei den hier durchgeführten Infektionsexperimenten wurde klar, daß es zur erfolgreichen Infektion einer relativ großen Menge an Viren pro Zelle bedarf, nämlich mindestens 1.000 Genomäquivalente (*ge*) / Zelle. Selbst bei einer so hohen Infektionsdosis war die Effizienz der Infektion mit maximal 1% der Zellen sehr gering. Allerdings konnte durch diese Versuche erstmals überhaupt die Infektionseffizienz in

diesem *in vitro*-System beurteilt werden. Vorher konnte nur die Menge des neu synthetisierten HBs- bzw. HBe-Antigens bestimmt werden, ohne daß man wußte, ob nun wenige infizierte Zellen große Mengen viraler Proteine synthetisieren, oder viele infizierte Zellen kleine Mengen. Analoges gilt für die quantitativen mRNA- und Virus-DNA-Bestimmungen. Diese Frage kann zwar auch hier nicht mit abschließender Sicherheit beantwortet werden, da es im Rahmen dieser Arbeit nicht gelang, in den Überständen der relativ kleinen Zellkulturen soviel HBs- oder HBe-Antigen zu messen, daß sich die Meßwerte sicher positiv gegen das Hintergrundsignal der Meßmethode abgrenzen ließen. Wegen der permanent geringen Infektionseffizienz, und der deutlich meßbaren HBs- und HBe-Antigen-Produktion in größeren Zellkultursystemen, liegt jedoch die Vermutung nahe, daß eher eine kleine Anzahl infizierter Zellen mit einer relativ hohen Syntheserate virale Proteine produziert.

Aus weiterführenden Experimenten der Arbeitsgruppe ist mittlerweile bekannt, daß sich die Infektionseffizienz durch den Einsatz größerer Virusmengen auf bis zu 20 % der Zellen steigern läßt (GLEBE und Mitarbeiter, persönliche Mitteilung).

Weiterhin ist aber noch weitgehend unklar, wie viele HBV-Genome sich in einer infizierten Zelle befinden, genauso wie der Umfang viraler mRNA-Transkripte. Diese Frage ließe sich eventuell durch eine quantitative PCR bzw. RT-PCR an durch Mikrodissektion gewonnenen infizierten Einzelzellen beantworten.

Des weiteren ist festzustellen, daß unter Verwendung von Nukleinsäure-amplifikationstechniken eine HBV-Infektion primärer Tupaiahepatozyten bereits bei einer Infektionsdosis von 10 *ge* / Zelle nachweisbar war, im Gegensatz zu 1000 *ge* / Zelle beim immunzytochemischen Nachweis (Beobachtungen in der Arbeitsgruppe, vgl. GLEBE *et al.* 2003). Dieser Umstand liegt sicherlich in der höheren Sensitivität der ersteren Nachweismethode begründet. Gleichzeitig bedarf es sicherlich weniger Zeit, bis eine infizierte Zelle genügend virale mRNA produziert hat, um diese nachweisen zu können, als bis sie genügend HBsAg synthetisiert und akkumuliert hat, um dieses immunzytochemisch erfassen zu können.

Bei der Verwendung höherer Infektionsdosen (hier: 1000 statt 10 *ge* / Zelle) ist es möglich, daß jede infizierte Zelle mehrfach infiziert wird, und infolgedessen auch mehr mRNA für die Synthese viraler Proteine bildet. Dies hätte eine umfangreichere Produktion von HBsAg zur Folge, und damit eine frühere und bessere immunzytochemische Nachweisbarkeit.

Dieser Umstand müßte bei einer Abschätzung der Infektionseffizienz auf der Grundlage einer immunzytochemischen Darstellung berücksichtigt werden; bei der Verwendung geringer Infektionsdosen könnten durchaus mehr Zellen infiziert sein, als sich immunzytochemisch darstellt.

Mit den obigen Überlegungen stimmt auch die Beobachtung überein, daß der Nachweis von HBsAg im Zellkulturüberstand mittels ELISA in der Regel bereits am sechsten Tag *post infectionem* positiv wird (Beobachtungen in der Arbeitsgruppe, vgl. GLEBE *et al.* 2003). Während die Menge sezernierten HBsAgs schon am sechsten postinfektiösen Tag ausreicht, um mittels ELISA erfaßt zu werden, ist die Menge des intrazellulär akkumulierten HBsAgs noch nicht groß genug, um immunzytochemisch nachgewiesen werden zu können. Hierbei spielt vermutlich auch eine höhere Sensitivität des ELISAs gegenüber der Immunzytochemie eine Rolle.

In den Arbeiten von WALTER *et al.* (1996) wurde der Nachweis der *in vivo*-Infektion von Tupaia durch immunhistochemische Anfärbung von HBs- und HBc-Antigen in Leber-Schnittpräparaten erst an den Tagen 15 bzw. 17 *p.i.* geführt. Ob dieser Nachweis schon früher positiv ausgefallen wäre, ist nicht beschrieben.

Vergleich der Verteilungsmuster von HBsAg in primären Tupaiahepatozyten und menschlicher Leber. Die *in vitro*-Infektion primärer Tupaiahepatozyten mit HBV sollte idealerweise ein Modell für die HBV-Infektion der menschlichen Leber *in vivo* sein. Unter der Annahme, daß Infektion und Virusreplikation in beiden Systemen gleichartig verlaufen, sollte auch die intrazelluläre Lokalisation der verschiedenen Virusbestandteile (Nukleinsäuren, HBsAg, HBcAg, ...) gleichartig sein. Es ist bekannt, daß HBcAg überwiegend in den Zellkernen der Hepatozyten zur Darstellung kommt, während HBsAg praktisch ausschließlich im Zytoplasma, besonders im endoplasmatischen Retikulum, nachweisbar ist. Bei der chronischen Hepatitis B-Infektion des Menschen bedingt eine exzessive Speicherung von LHBs-Protein im endoplasmatischen Retikulum histologisch das charakteristische Bild der „Milchglashepatozyten“ in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

Bei den hier durchgeführten Infektionsversuchen fiel eine sehr markante Verteilung des neu synthetisierten HBsAgs in den primären Tupaiahepatozyten auf: Fast immer fand sich eine schmale Zone mit einer besonders hohen Konzentration an HBsAg, die dem Zellkern direkt außen anlag, und ihn wie eine Korona umschloß (Abb. 4-3.1; vgl. auch Abb. 3-3.3 - 3.3.8 im Ergebnisteil). Dieser Bereich der Zelle entspricht in der Regel

dem rauhen endoplasmatischen Retikulum. Im übrigen war das HBsAg ziemlich homogen über das gesamte Zytoplasma verteilt.

Dieses Verteilungsmuster unterscheidet sich in einigen Aspekten von demjenigen, welches bei der akuten HBV-Infektion des Menschen in histologischen Leber-Schnittpräparaten beobachtet werden kann. Hierbei zeigen sich unterschiedliche Muster, teilweise im selben Präparat gleichzeitig (Abb. 4-3.1): Zum einen gibt es, vergleichbar mit den Befunden bei primären Tupaiahepatozyten, Präparate mit nur sehr wenigen HBsAg-positiven Zellen, bei denen das HBsAg dann ganz vorwiegend perinukleär lokalisiert ist. Diese Verteilungsmuster wird mit einer „klassischen“ akuten Hepatitis in Verbindung gebracht (RAY *et al.* 1976). Zum anderen finden sich Präparate mit Zellen, bei denen sich das HBsAg ganz überwiegend direkt an oder in der Zytoplasmamembran befindet, kaum jedoch im Zytoplasma selber (Abb. 4-3.1 C). Die pathophysiologischen Grundlagen dieses Verteilungsmuster sind noch weitgehend unklar. Einige Autoren sehen eine Korrelation dieses Musters mit einem Sistieren der Virusreplikation in den infizierten Hepatozyten, einhergehend mit der Integration von HBV-DNA in das Genom der Wirtszelle (DIENES *et al.* 1990, HSU *et al.* 1988). Dieses Phänomen kann vor allem bei nicht-virämischen HBV-Infizierten beobachtet werden. Warum sich im Falle einer sistierenden Virusreplikation das HBsAg direkt plasmalemmal anreichern soll, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. DIENES *et al.* (1990) konnten in ihren Untersuchungen an histologischen Präparaten von Lebern mit chronischer HBV-Infektion zeigen, daß es sich bei dem plasmamembran-assoziierten HBsAg vorwiegend um LHBs handelt. In den Zellen mit sistierender Virusreplikation liegt die virale DNA häufig nicht mehr episomal vor, sondern wurde in das Wirtsgenom integriert. Vermutet wird, daß dadurch die Transkription und Translation des LHBs-Gens gegenüber den SHBs- und MHBs-Genen relativ gesteigert wird. Während viel LHBs produziert wird, ist die Synthese von SHBs und MHBs stark reduziert (DIENES *et al.* 1990). Da das LHBs aber nur sezerniert werden kann, wenn intrazellulär ein Überschuß an SHBs vorliegt, kumuliert es intrazellulär, teilweise im endoplasmatischen Retikulum, häufig jedoch auch in hohen Konzentration in der Zytoplasmamembran. Der Grund für die Sekretionshemmung sind bestimmte Sequenzen der PräS1-Domäne, die als starkes Retentionssignal wirken (GALLINA *et al.* 1995). Warum das LHBs jedoch in einigen Fällen direkt an der Zytoplasmamembran akkumuliert, und in anderen im endoplasmatischen Retikulum, ist noch unklar.

Andere Autoren vermuten hingegen, daß ein peripheres HBsAg-Verteilungsmuster mit der Immunantwort des Wirtsorganismus zusammenhängt, beziehungsweise ein bestimmtes Interaktionsmuster von Zellen des Immunsystems mit infizierten Hepatozyten reflektiert (u.a. RAY *et al.* 1976). So wird ein peripheres Verteilungsmuster bei Fällen von akuter Hepatitis mit möglichem Übergang in die Chronizität gefunden, sowie bei chronisch-aggressiver Hepatitis. In den hier durchgeführten Experimenten mit primären Tupaiahepatozyten konnte ein solches Muster allerdings nicht beobachtet werden. Dies mag ein Indiz dafür sein, daß dieses Verteilungsmuster in der Tat auf der Aktivität des Immunsystems beruht, da dieses in der Hepatozytenkultur natürlich nicht vorhanden ist.

Die Überlegung, daß sich der intensive HBsAg-Nachweis an der Plasmamembran darauf zurückführen lassen könnte, daß es sich um subvirale Partikel aus dem zirkulierenden Blut handelt, die an die Zelloberfläche gebunden haben, ist relativ unwahrscheinlich. Denn Hepatozyten mit einem derartigen Färbemuster kommen bevorzugt bei chronisch HBV-Infizierten mit nur geringer Virämie und HBs-Antigenämie vor. Zudem ist bei diesen Personen häufig nur extrem wenig LHBs im Serum zu finden, welches den größten Anteil des zytoplasmamembran-assoziierten HBsAgs ausmacht (DIENES *et al.* 1990). Wenn nur wenig LHBs im Serum vorkommt, kann auch nur sehr wenig LHBs an Leberzellen binden. Nur geringe Mengen von gebundenem HBsAg entziehen sich mit großer Wahrscheinlichkeit der immunhistochemischen Nachweisbarkeit, wie aus den hier durchgeführten Bindungsversuchen bekannt ist (vgl. Kapitel 3.4.1.1). Daher ist anzunehmen, daß das an der Plasmamembran gebundene LHBs wahrscheinlich nicht von „extern“ aus der Blutzirkulation stammt, sondern viel eher von intrazellulär.

In einigen histologischen Präparaten von Lebern mit akuter HBV-Infektion läßt sich in den Hepatozyten eine sehr homogene Verteilung des HBsAgs über das gesamte Zytoplasma darstellen, jedoch ohne einen erkennbaren perinukleären Randsaum (Abb. 4-3.1 D). Häufiger wird dieses Muster jedoch bei chronisch-persistierender HBV-Infektion bzw. bei HBV-induzierter Leberzirrhose mit geringer Aktivität gefunden (RAY *et al.* 1976). Aber auch bei einigen *in vitro* infizierten Tupaiahepatozyten zeigten eine derartige Verteilung des HBsAgs (Abb. 4-3.1 B). Vermutlich spiegelt dieses homogene Verteilungsmuster einen späteren Zeitpunkt der akuten HBV-Infektion wider, in dem schon mehr HBsAg gebildet wurde und intrazellulär akkumuliert ist, als das Muster mit der HBsAg-Verteilung in Form einer perinukleären Korona.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es eine weitgehende Übereinstimmung der Verteilungsmuster des HBsAg bei der akuten Infektion des Menschen und bei der Infektion primärer Tupaiahepatozyten gibt. Lediglich eine vorwiegend periphere / Zytoplasmamembran-assoziierte Ansammlung von HBsAg wurde in den hier durchgeführten Infektionen von Tupaiahepatozyten nicht beobachtet. Dies bekräftigt die oben genannte Hypothese der Induktion dieses Verteilungsmusters durch die Aktivität des Immunsystems.

Anzumerken sei noch, daß sich die Infektion der primären Tupaiahepatozyten nach 12 Tagen in einem noch sehr frühen Stadium befindet. Dahingegen beträgt die Inkubationszeit der natürlichen HBV-Infektion des Menschen zwischen 45 und 180 Tagen (GERLICH und SCHAEFER 2002), der exakte Zeitpunkt der Infektion ist häufig nicht sicher bekannt. Aus diesem Grunde befindet sich diese Infektion bei Diagnosestellung praktisch immer in einem fortgeschritteneren Stadium, als die hier dargestellten Infektionen primärer Tupaiahepatozyten. Damit spiegelt der immunhistochemische Befund, der bei der akuten HBV-Infektion des Menschen erhoben werden kann, meistens das Verteilungsmuster von HBsAg zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion wider. Dahingegen scheint das in primären Tupaiahepatozyten beobachtete Verteilungsmuster mit der perinukleären Korona charakteristisch zu sein für die frühen Phasen der HBV-Infektion.

Die unterschiedlichen HBsAg-Verteilungsmuster reflektieren also vermutlich unterschiedliche Stadien beziehungsweise Zustände der HBV-Infektion. Eine schematische Übersicht dieser Zusammenhänge gibt Abb. 4-3.2, wobei ausdrücklich erwähnt sei, daß diese Darstellung noch einen stark hypothetischen Charakter hat.

Im übrigen sei an dieser Stelle noch darauf hingewiesen, daß die Diagnose einer akuten HBV-Infektion beim Menschen in der Regel vorwiegend serologisch gestellt wird. Eine Leberbiopsie zur Diagnosestellung oder -sicherung bei eindeutigen serologischen Befunden ist wegen der damit verbundenen Komplikationen und der Belastung für den Patienten eine Ausnahme, und sollte dies auch bleiben. Für die Beurteilung des Aktivitätsgrades einer chronischen Hepatitis B ist diese Untersuchung allerdings nach wie vor unverzichtbar.

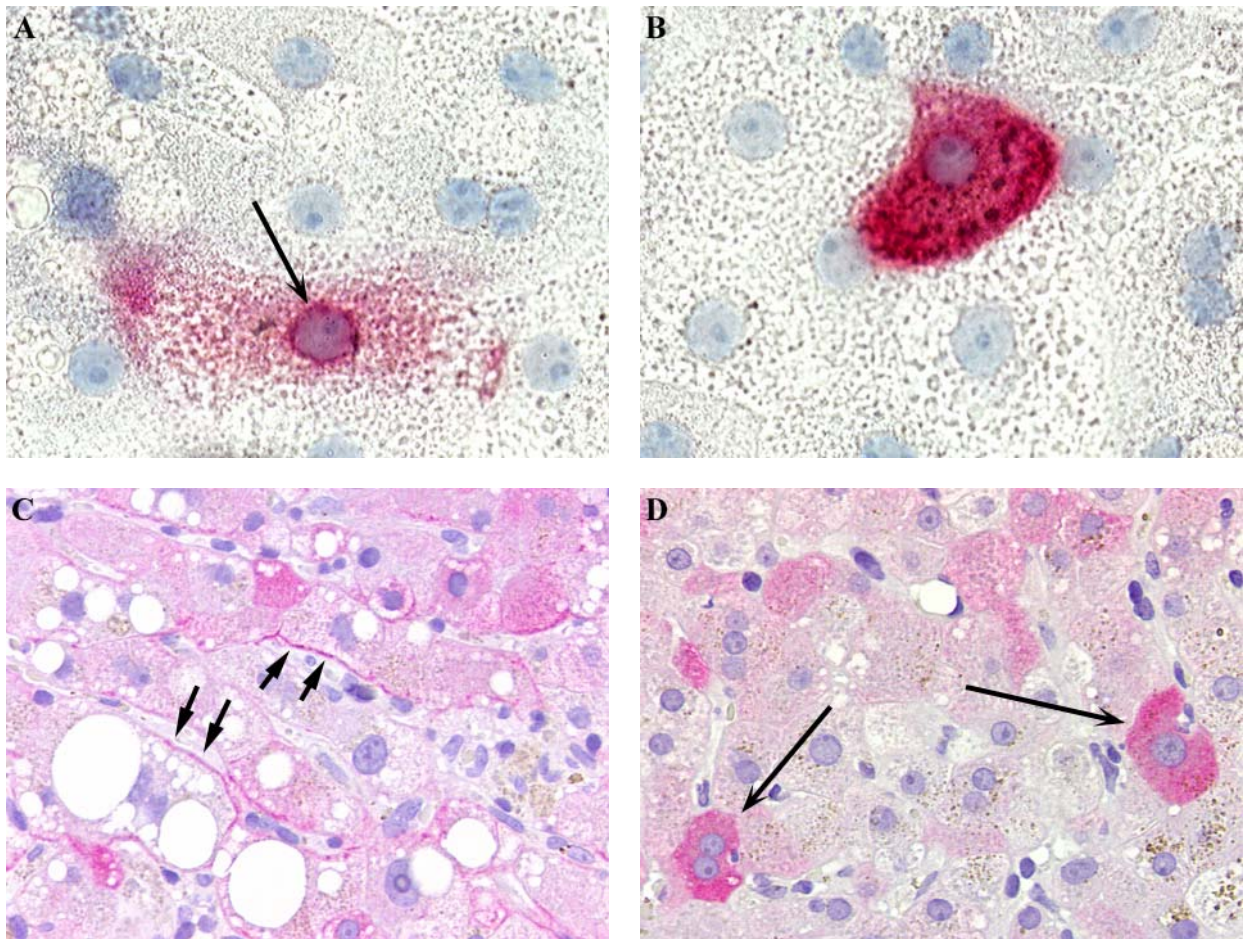


Abb. 4-3.1: Unterschiedliche Verteilungsmuster von HBsAg (rot) in Hepatozyten bei akuter HBV-Infektion.

A, B: Primäre Tupaiahepatozyten, Tag 12 *p.i.*: In der überwiegenden Zahl infizierter Zellen findet sich ein charakteristischer, intensiver perinukleärer Saum von HBsAg, der den Zellkern wie eine Korona umschließt (**A**, Pfeil), bei sonst relativ homogener Verteilung im übrigen Zytoplasma. In einigen Zellen verteilt sich das HBsAg so homogen über das gesamte Zytoplasma, daß sich die perinukleäre Korona kaum noch erkennen läßt (**B**).

C, D: Menschliche Leber, genauer Zeitpunkt der Infektion nicht sicher bekannt: In einigen Zellen stellt sich HBsAg fast ausschließlich als schmaler, direkt an der Plasmamembran gelegener Saum dar (**C**, kurze Pfeile). In den meisten Zellen ist das HBsAg sehr homogen über das Zytoplasma verteilt (**D**, lange Pfeile). Eine perinukleäre Korona höherer Signalintensität läßt sich in diesem Präparat nicht erkennen.

Der immunzytochemische bzw. immunhistochemische Nachweis von HBsAg wurde in beiden Präparaten mit äquivalenten Methoden unter Verwendung des gleichen Antikörpers und der gleichen Reagentien geführt. Gegenfärbungen mit Hämalaun (blau), Mikroskopvergrößerungen 400x.

Bilder **C** und **D** wurden freundlicherweise angefertigt und zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. R. M. BOHLE, Institut für Pathologie am Klinikum der JLU Gießen.

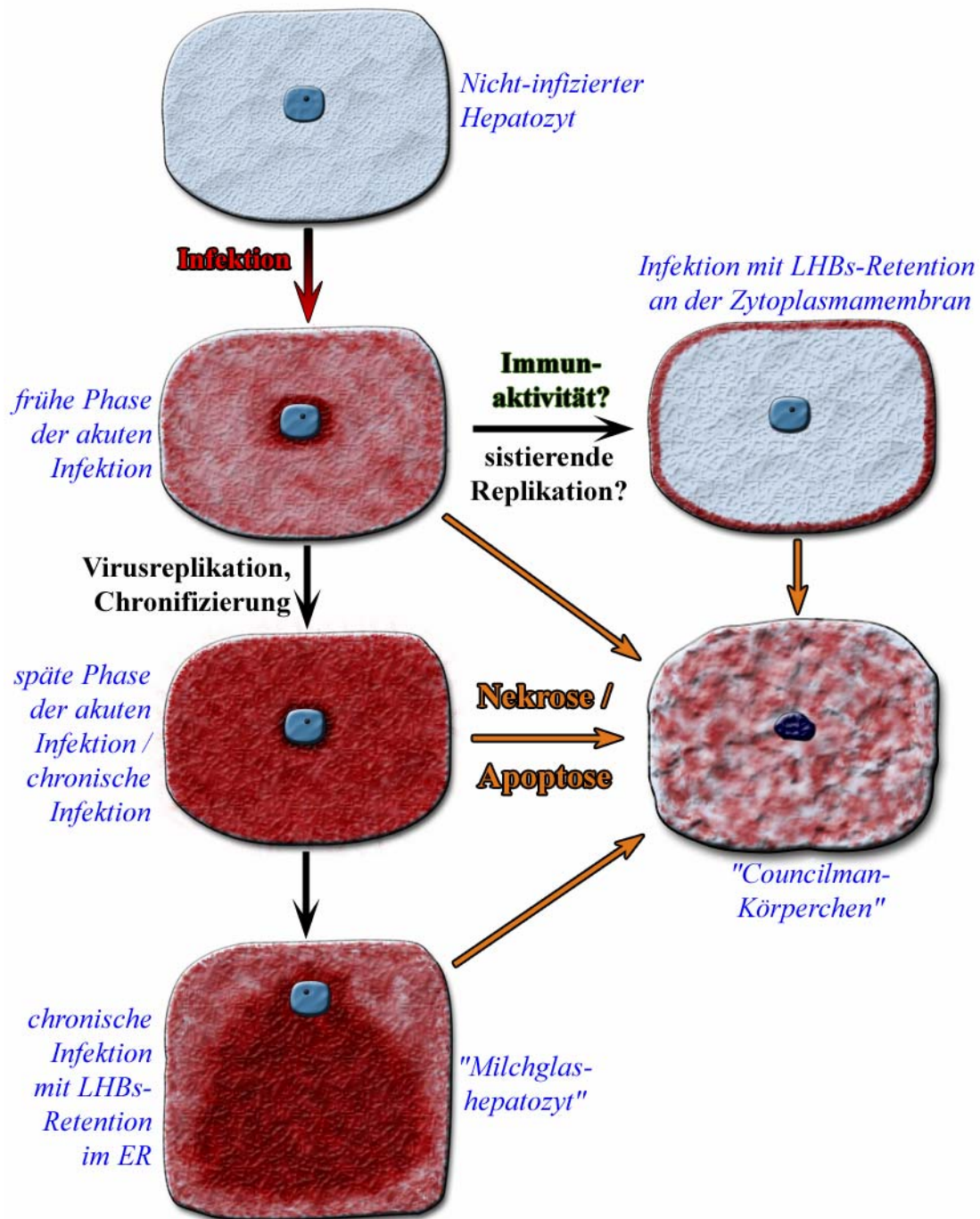


Abb. 4-3.2: Hypothetische Entwicklung charakteristischer Verteilungsmuster von HBsAg (rot) in Hepatozyten im Verlauf einer HBV-Infektion.

Bei einer genügend starken Infektion akkumuliert das HBsAg zunächst verstärkt perinukleär, so daß eine charakteristische „Korona“ entsteht. Im weiteren Verlauf verteilt sich das HBsAg homogen über das gesamte Zytoplasma.

Bei einer chronischen Infektion kann es zu einer exzessiven Speicherung von LHBs im endoplasmatischen Retikulum kommen, was den Zellen ein charakteristisches Aussehen verleiht (sogenannte „Milchglashepatozyten“).

Einige infizierte Zellen weisen lediglich einen schmalen, plasmalemmalen Saum von HBsAg bzw. LHBs auf, möglicherweise bedingt durch die Aktivität des Immunsystems oder aber durch ein Sistieren der Virusreplikation.

Infizierte Zellen können jederzeit der Apoptose oder Nekrose anheimfallen; die sterbenden Zellen werden auch als „Councilman-Körperchen“ bezeichnet.

Beziehung zwischen der Infizierbarkeit primärer Tupaiahepatozyten mit HBV und ihrer Lage im Zellverband. Bei den hier durchgeführten Infektionsexperimenten waren HBV-infizierte primäre Tupaiahepatozyten ausschließlich inmitten größerer Zellverbände zu finden, nie war eine Infektion in einer solitär liegenden Zelle nachzuweisen. Wie im zweiten Kapitel der Diskussion schon erläutert, sind die Zellen im Inneren eines Zellverbandes anders differenziert als Einzelzellen. Daher ist anzunehmen, daß die Suszeptibilität primärer Tupaiahepatozyten für eine HBV-Infektion vom Differenzierungszustand dieser Zellen abhängig ist. Hierbei scheint die Fähigkeit der Zellen, Viruspartikel binden und aufnehmen zu können, nicht der entscheidende Faktor zu sein. Wie gezeigt wurde, können wesentlich mehr Zellen, darunter auch solitär liegende, HBsAg binden und aufnehmen, als infiziert werden können. Vielmehr scheint nach der Internalisation der Viruspartikel noch ein weiterer Schritt notwendig zu sein, um eine Infektion zu erreichen, wobei dieser Schritt von der Differenzierung der Zellen abhängig ist. Dies könnte beispielsweise ein Co-Rezeptor sein, der nur unter bestimmten Bedingungen exprimiert wird, aber für die Infektion essentiell ist. Damit gäbe es nicht nur einen HBV-Rezeptor, sondern einen Rezeptorkomplex, wie dies zum Beispiel auch für den Infektionsvorgang bei den Avihepadnaviren (z.B. DHBV) vermutet wird. In diesem Fall wird davon ausgegangen, daß neben Carboxypeptidase D noch weitere Co-Rezeptoren am Infektionsvorgang beteiligt sind (vgl. BREINER *et al.* 1998, TONG *et al.* 1999). Ein weiteres Beispiel für die Infektion über einen Multirezeptorkomplex ist das Humane Immundefizienz-Virus (HIV); dieses Virus benötigt neben dem CD4-Rezeptor, an den es primär bindet, weitere Chemokinrezeptoren, um T-Lymphozyten infizieren zu können (BLEUL *et al.* 1997). Ob diese Hypothese auch für die Orthohepadnaviren zutrifft, müssen weitere Untersuchungen klären.

Interessant ist in diesem Zusammenhang weiterhin, daß auch in der menschlichen Leber die HBV-Infektion immunhistologisch häufiger in Hepatozyten nachgewiesen wird, die in Gruppen zusammenliegen, als in solchen Hepatozyten, die quasi als „Einzelzellen“ ausschließlich von nicht-hepatozytären Zellen der Leber (Fibroblasten, KUPFFER-Zellen, Sternzellen, etc.) umgeben sind (DIENES *et al.* 1990).

b) Infektion kryopräservierter Zellen. Bis zur Anfertigung dieser Arbeit war nicht bekannt, ob sich primäre Tupaiahepatozyten auch dann noch mit HBV infizieren lassen, wenn sie kryopräserviert und wieder aufgetaut wurden. Alle bisherigen *in vitro*-Infektionen wurden ausschließlich an frisch isolierten Zellen durchgeführt (vgl. u.a. WALTER *et al.* 1996, KÖCK *et al.* 2001). Da ein Einfrier-Auftau-Zyklus, zumindest vorübergehend, einen tiefreichenden Eingriff in den Zellstoffwechsel darstellt, könnte es möglich sein, daß primäre Tupaiahepatozyten nach einer solchen Prozedur eine HBV-Infektion nicht mehr unterstützen. Hier konnte allerdings gezeigt werden, daß kryopräservierte Zellen sehr wohl mit HBV infizierbar sind. Dabei war in keinerlei Hinsicht ein Unterschied zur Infektion frisch isolierter Zellen erkennbar, weder in der Infektionseffizienz, noch in dem Verteilungsmuster des HBsAgs.

Es ist davon auszugehen, daß der Infektionsvorgang bei kryopräservierten und frisch isolierten Zellen gleich abläuft.

In Analogie zu diesen Ergebnissen konnten DANDRI *et al.* (2001) zeigen, daß primäre *woodchuck*-Hepatozyten nach Kryopräservierung für die Infektion mit dem Woodchuck Hepatitis-Virus (WHV) suszeptibel bleiben. WHV ist ein animales Orthohepadnavirus, welches mit dem humanen HBV eng verwandt ist; aus diesem Grund wird die WHV-Infektion auch als Tiermodell für die HBV-Infektion des Menschen eingesetzt (vgl. TENNANT u. GERIN 2001).

Weiterhin wurde hier gezeigt, daß die kryopräservierten Zellen bereits einen Tag nach dem Auftauen mit HBV infizierbar sind, und diese Fähigkeit mindestens bis zum vierten Tag erhalten bleibt. Welches der optimale Zeitpunkt für die Infektion ist, müssen weitere Untersuchungen klären; in den hier durchgeführten Experimenten konnte kein wesentlicher Unterschied hinsichtlich der Infektionseffizienz erkannt werden.

4.3.2 Infektion durch HepG2.2.15-Zellkulturüberstand

Die Zelllinie HepG2 ist eine schon lange bestehende und gut charakterisierte humane Hepatomzelllinie, deren Zellen relativ hoch differenziert sind. Sie produzieren unter anderem 17 der Haupt-Plasmaproteine des Menschen, darunter zum Beispiel Albumin, Transferrin, Haptoglobin, α -Fetoprotein, α_1 -Antitrypsin, einige Komplement- und Gerinnungsfaktoren und vieles mehr. HBsAg produzieren sie natürlicherweise nicht (ADEN *et al.* 1979, KNOWLES *et al.* 1980). HepG2-Zellen sind nicht suszeptibel für eine HBV-Infektion, unterstützen allerdings die Virusreplikation, wenn die Virus-DNA künstlich in die Zellen eingebracht wird. Durch stabile Transfektion dieser Zellen mit

einem Plasmid, das mehrere vollständige HBV-Genome enthält, ist vor etwa 20 Jahren die Zelllinie HepG2.2.15 hervorgegangen. HepG2.2.15-Zellen produzieren und sezernieren sowohl vollständige Virionen, als auch die verschiedenen Formen subviraler Partikel. Die Viren entsprechen dem Genotyp D (vgl. SELLS *et al.* 1987). Eine genauere Charakterisierung dieser Sekretionsprodukte durch POSSEHL (1994) ergab, daß HepG2.2.15-Zellen verschieden reife Virionen sezernieren. Nur eine Subfraktion enthält das vollständige HBV-Genom, viele Viruspartikel enthalten nur ein unvollständiges Genom, oder sogar gar keine DNA. Die Umhüllung der Kapside ist häufig lückenhaft und unvollständig; jedoch entspricht die Struktur der verschiedenen Hüllproteine im Wesentlichen derjenigen *in vivo* entstandener Viren. Die Hüllen der Viren aus HepG2.2.15-Zellen enthalten relativ viel LHBs (GERLICH u. HEERMANN 1991), Struktur und Glykosylierung des LHBs sind wohl praktisch identisch mit dem *in vivo* synthetisierten Protein (POSSEHL 1994). Die subviralen Partikel aus HepG2.2.15-Zellen unterscheiden sich nicht wesentlich von denjenigen aus dem Serum HBV-infizierter Menschen (POSSEHL 1994).

Der Zellkulturüberstand von HepG2.2.15-Zellen wurde bisher noch nicht zur Infektion von Tupaia oder Tupaiahepatozyten benutzt; jedoch wurden damit schon Schimpansen *in vivo* mit HBV infiziert (ACS *et al.* 1987). Auch wurde die Infektion primärer humaner Hepatozyten und von HepaRG-Zellen durch Viren beschrieben, die unter Zuhilfenahme von PEG aus dem Zellkulturüberstand von HepG2.2.15-Zellen präzipitiert wurden (GRIPON *et al.* 2005), allerdings erst nach Abschluß der hier durchgeführten Experimente. Abgesehen von dem Umstand, daß viele der von HepG2.2.15-Zellen produzierten Viruspartikel nicht ganz intakt sind, und sich hierdurch von den „natürlichen“ Virionen unterscheiden, bietet die Verwendung dieser Zellen als Quelle für Hepatitis B-Viren einige Vorteile gegenüber dem Serum chronisch HBV-Infizierter: Es ist relativ schwierig, geeignete HBV-infizierte Spender zu finden, und da diesen Personen zur Virusgewinnung immer relativ viel Blut abgenommen werden muß, ist diese Virusquelle gewissen Limitationen unterworfen. HepG2.2.15-Zellen hingegen können problemlos in größeren Mengen zur Virusproduktion angezüchtet werden, und stellen eine kontinuierlich verfügbare Virusquelle dar, auch wenn die Konzentration vollständiger Viren im Zellkulturüberstand nicht so hohe Werte erreicht wie die Viruskonzentration im Serum chronisch infizierter Menschen. Weitere Vorteile werden aus der Interpretation der Versuchsergebnisse ersichtlich:

In den hier durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, daß primäre Tupaiahepatozyten durch Inkubation mit HepG2.2.15-Zellkulturüberstand eine HBV-Infektion akquirieren. Dabei ist zu beachten, daß der Zellkulturüberstand ungereinigt war. Das heißt, daß sich darin neben infektiösen Viren auch subvirale Partikel, defekte und unvollständige Viren befanden, sowie auch die diversen Plasmaproteine, welche von HepG2-Zellen produziert werden (und damit höchstwahrscheinlich auch von HepG2.2.15-Zellen). Ein falsch-positiver Infektionsnachweis, bedingt durch eine Kreuzreaktion der eingesetzten Antikörper mit anderen Sekretionsprodukten aus dem HepG2.2.15-Überstand, die von den Tupaiahepatozyten hätten aufgenommen und gespeichert werden können, konnte ausgeschlossen werden, da die Inkubation von Tupaiahepatozyten mit HepG2-Überstand zu keiner immunzytochemischen Anfärbung führte.

Die Effizienz dieses Infektionsmodus war nicht geringer als die, die mit gereinigten Viren erreicht wurde, sondern sogar höher. Zwar wurden in beiden Infektionsmodi etwa gleich viele Zellen infiziert, bei gereinigten Viren waren dafür jedoch etwa 1.000 *ge* / Zelle notwendig, während sich im HepG2.2.15-Überstand so viele HBV-Genome befanden, daß dies etwa 150 *ge* / Zelle entsprachen hat. Dabei muß noch zusätzlich beachtet werden, daß nicht alle HBV-Genome in diesem Zellkulturüberstand infektiösen Viren zugeordnet werden können, sondern eine nicht unerhebliche Anzahl auch frei oder in defekten Viren vorliegt. Welche Faktoren für diese gesteigerte Infektionseffizienz verantwortlich sind, ist nicht klar. Möglich wäre, daß die Viren aus menschlichem Serum beim Reinigungsvorgang in irgendeiner Art und Weise modifiziert, und in ihrer Infektiosität beeinträchtigt werden. Der HepG2.2.15-Überstand wurde ungereinigt als Inokulat verwandt. Dies bedeutet nicht nur, daß dadurch eventuell schädigende Einflüsse auf die Virionen vermieden werden, sondern auch eine enorme Arbeits-, Zeit- und Kostenersparnis. Ein anderer Aspekt ist, daß eventuell bestimmte Faktoren, die von HepG2.2.15-Zellen produziert und in das Zellkulturmedium abgegeben werden, eine Infektion begünstigen können. Durch die fehlende Abtrennung der Viren von diesen Faktoren würden sie im Inokulat erhalten bleiben. Die Beeinflussung von Funktionen eines Zelltyps, in diesem Falle primäre Tupaiahepatozyten, durch lösliche Faktoren in einem Kulturmedium, in dem sich vorher ein anderer Zelltyp befunden hat (hier: humane Hepatoblastomzellen), wird widersprüchlich diskutiert. Während einige Arbeitsgruppen einen Einfluß auf Differenzierung und Zellfunktionen festgestellt haben, wird dies von anderen

Arbeitsgruppen verneint (vgl. BHATIA *et al.* 1999). Jedenfalls scheint es so zu sein, daß der oben erwähnte Faktor im menschlichen Serum, der eine HBV-Infektion primärer Tupaiahepatozyten inhibiert, von HepG2.2.15-Zellen entweder gar nicht hergestellt wird, oder aber in nur so geringen Mengen, daß dies nicht relevant ist. BRUNS *et al.* (1998) haben von der Infektion des Enten-Hepatitis B-Virus (DHBV) berichtet, daß die Infektionseffizienz *in vitro* bei Anwesenheit subviraler Partikel im Virusinokulat stärker ist, als wenn nur mit Viren infiziert wird. Falls im ungereinigten HepG2.2.15-Überstand mehr subvirale Partikel enthalten wären, als in den hochreinen Viruspräparationen, könnte in Analogie zur DHBV-Infektion allein hierdurch die Infektionseffizienz höher sein. Weniger wahrscheinlich ist hingegen die Möglichkeit, daß einige der defekten bzw. unvollständig umhüllten Viren aus HepG2.2.15-Zellen eine höhere Infektiosität besitzen als intakte Viren. Eher wahrscheinlich ist sogar, daß eine Veränderung der HBs-Proteine zu einer verminderten Infektiosität führen würden, wie aus vielen Mutationsexperimenten bekannt ist. Zur Erklärung der erhöhten Infektionseffizienz sind folglich noch weitere Untersuchungen notwendig.

4.3.3 Infektion durch temporäre Co-Kultivierung mit HepG2.2.15-Zellen

Die Co-Kultivierung von Hepatozyten mit anderen Zellen beeinflusst die Differenzierung und diverse Stoffwechselvorgänge der Hepatozyten auf diffizile, längst noch nicht vollständig überschaubare Art und Weise. Derartige Effekte werden dabei nicht nur durch Co-Kultivierung anderer Zellen der Leber (Sternzellen, KUPFFER-Zellen, nicht-parenchymatische Leberzellen, ...) erzielt, sondern auch, wenn man Zellen aus anderen Organsystemen, oder sogar aus anderen Spezies verwendet. Die Beeinflussung der Hepatozyten findet auf mehreren Wegen statt, sowohl über homo- und heterotypische Zell-Zell-Kontakte (*tight junctions* und / oder *gap junctions*), als auch über andere membrangebundene Faktoren, und schließlich auch lösliche Faktoren, wie zum Beispiel Zytokine. Das Ausmaß der Bedeutung letzterer Faktoren wird allerdings sehr kontrovers diskutiert (BHATIA *et al.* 1999). In den hier durchgeführten Experimenten fand eine Co-Kultivierung nur in einer solchen Form statt, daß sich die verschiedenen Zelltypen (primäre Tupaiahepatozyten und HepG2.2.15- bzw. HepG2-Zellen) nicht berühren konnten, und somit nur über humorale Mechanismen miteinander in Kontakt treten konnten. Weiterhin konnte eine mögliche Interaktion nur temporär, über wenige Stunden stattfinden, und nicht die gesamte Kultivierungsdauer lang. Durch diese Form der Co-Kultivierung von primären Tupaiahepatozyten mit den HBV-

produzierenden HepG2.2.15-Zellen konnte eine Infektion der Tupaiahepatozyten mit HBV erreicht werden, wie der immunzytochemische Nachweis von HBsAg zehn Tage nach der Co-Kultivierung zeigte. Die Effizienz dieses Infektionsmodus war dabei wesentlich höher als bei Verwendung gereinigter Viren oder nur des Zellkulturüberstandes von HepG2.2.15-Zellen; nach der Co-Kultivierung konnte in bis zu vier Prozent der Tupaiahepatozyten eine HBV-Infektion nachgewiesen werden, während dies sonst immer nur bei maximal einem Prozent der Zellen gelang. Welche Faktoren für diese bemerkenswerte Steigerung der Infektionseffizienz verantwortlich sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter aufgeklärt werden; um dies zu klären, bedarf es noch weiterer Untersuchungen. Denkbar wäre jedoch, daß es in der Zeit der Co-Kultivierung zu einer Interaktion der beiden Zelltypen auf humoralem Wege kam, und daß dadurch die primären Tupaiahepatozyten derart beeinflußt wurden, daß sie in der Folge leichter suszeptibel für eine HBV-Infektion waren.

Zusätzlich sei hier noch erwähnt, daß in diesem Infektionsmodus erstmals in zwei direkt nebeneinander liegenden Zellen eine HBV-Infektion nachgewiesen werden konnte. Dabei ist unklar, ob diese Zellen jeweils unabhängig voneinander infiziert wurden, oder ob es eventuell zu einer horizontalen Ausbreitung der Infektion von einer Zelle zur anderen gekommen ist. Ob es eine solche Ausbreitung gibt, und durch welche Strukturen sie im positiven Fall vermittelt wird, ist nicht bekannt, und müßte weiter untersucht werden. Weiterhin wäre es möglich, daß es sich ursprünglich um eine Zelle gehandelt hat, die sich nach der Infektion mitotisch geteilt hat.

4.3.4 Inhibition der HBV-Infektion primärer Tupaiahepatozyten durch neutralisierende Antikörper

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Infektion primärer Tupaiahepatozyten mit HBV durch die Zugabe bestimmter Antikörper inhibiert werden kann. Einerseits kann dies durch polyklonale Anti-HBs-Antikörper erreicht werden. Die hier verwendeten Antikörper wurden durch aktive Immunisierung eines Schafes mittels subviraler Partikel gewonnen. Derart hergestellte Antikörper sind hauptsächlich gegen Epitope des SHBs gerichtet; besonders die *a*-Determinante des SHBs weist Epitope auf, die stark immunogen sind. Werden im Rahmen einer HBV-Infektion Anti-HBs-Antikörper gebildet, so sind dies in jedem Fall Antikörper gegen die *a*-Determinante. Zusätzlich treten bei ca. 75% der Infizierten Antikörper gegen die *d*- bzw. *y*-Determinante auf (BISWAS *et al.* 1976, HOOFNAGLE *et al.* 1977). Antikörper gegen

die *w*- bzw. *r*-Determinante werden nur selten, und dann in geringen Mengen beobachtet (HOOFNAGLE *et al.* 1977). Die Antikörperbildung nach aktiver Immunisierung gegen HBV verhält sich im Wesentlichen genauso. Nach den Untersuchungen von JILG *et al.* (1984) werden bei der aktiven Immunisierung des Menschen mit kompletten subviralen Partikeln durchschnittlich ca. 50% der Antikörper gegen die *a*-Determinante gebildet, und etwa ebensoviele gegen die *d*- bzw. *y*-Determinante. Jedoch besteht hierbei eine starke interindividuelle Variabilität (12-98% Anti-*a*, 28-61% Anti-*d* bzw. 2-88% Anti-*y*). Hier ist jedoch noch anzumerken, daß bei diesen Untersuchung nicht zwischen Anti-*a* und Anti-PräS-Antikörpern differenziert werden konnte. Bei der Immunisierung des Menschen mit kompletten SVP bilden etwa 2/3 der Geimpften Anti-PräS1-Antikörper, die in der Region der MA 18/07-Bindestelle (s.u.) binden (DEEPEN *et al.* 1990). Es ist zu vermuten, daß noch mehr Personen Antikörper gegen weitere Epitope der PräS1-Domäne bilden. Aus Untersuchungen von HEERMANN *et al.* (1987), in denen bestimmte Maus-Stämme und Meerschweinchen mit kompletten SVP immunisiert wurden, ist bekannt, daß die Antikörpertiter gegen die PräS-Domänen 12-25mal niedriger sind als der Gesamt-Anti-HBs-Titer. Dies entspricht dem molaren Verhältnis von PräS-Domänen gegenüber S-Domänen in den verwendeten Immunogenen (HBs-Filamente bzw. -Sphären), wobei die Filamente mehr PräS-Domänen aufweisen als die Sphären. In diesen Versuchen entwickelten im Übrigen wohl alle Tiere Anti-PräS1-Antikörper.

Da das oben genannte Schaf mit kompletten HBs-Filamenten unterschiedlicher HBsAg-Subtypen immunisiert wurde, ist davon auszugehen, daß die gebildeten Antikörper nicht nur eine Reaktivität gegen die *a*-Determinante, sondern auch gegen die *d*- und *y*-Determinante sowie die PräS2- und PräS1-Domäne zeigen.

Die heutzutage in Deutschland üblichen HBV-Aktivimpfstoffe (z.B. Engerix-B) bestehen ausschließlich aus rekombinantem SHBs eines Subtyps (u.a. STEPHENNE 1990). Mit ihnen ist eine Induktion von Antikörpern gegen die PräS-Domänen des HBsAgs nicht möglich.

Das protektive Potential von Anti-SHBs-Antikörpern ist hinreichend belegt (u.a. WATERS *et al.* 1992, COATES *et al.* 2001). Allerdings vermitteln nur Antikörper gegen die *a*-Determinante, die allen HBV-Subtypen gemeinsam ist, als sogenannte „gruppenspezifische Antikörper“ eine Immunität gegenüber Infektionen mit allen möglichen HBV-Subtypen (Kreuzimmunität). Subtypenspezifische Antikörper gegen die *d*- bzw. *y*-Determinante können keine Kreuzimmunität verleihen. Allerdings sind

auch bestimmte Antikörper gegen die PräS1-Domäne virusneutralisierend und protektiv (NEURATH *et al.* 1989, GERLICH *et al.* 1990, HONG *et al.* 2004). Ein protektiver Effekt von Anti-PräS2-Antikörpern wird kontrovers diskutiert: Während einige Autoren solchen Antikörpern ein schützendes Potential zuschreiben (NEURATH *et al.* 1986a, RYU *et al.* 1997), konnte dies von unserer Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden (vgl. GLEBE *et al.* 2003). Nach unseren Beobachtungen sind Anti-PräS2-Antikörper nur unvollständig virusneutralisierend, und können damit nicht ausreichend vor einer Infektion schützen.

Nach SCHULZE-BERGKAMEN *et al.* (2003) können Antikörper gegen SHBs, welche in Form eines Passivimpfstoffes kommerziell erhältlich sind, die HBV-Infektion primärer humaner Hepatozyten *in vitro* verhindern. In den hier durchgeführten Experimenten wurde nun gezeigt, daß auch die HBV-Infektion primärer Tupaiahepatozyten durch Anti-HBs-Antikörper erfolgreich inhibiert werden kann. Dies kann sowohl durch polyklonale Antikörper mit überwiegender Reaktivität gegen SHBs-Epitope erreicht werden, als auch durch den monoklonalen Antikörper MA 18/07, der an ein bekanntes Epitop der PräS1-Domäne bindet (Aminosäuren 20-23 beim Genotyp D (SOMINSKAYA *et al.* 1992)). Dieses Epitop liegt in dem Bereich der PräS1-Domäne, von der zunächst angenommen wurde, daß sie direkt mit dem putativen HBV-Rezeptor interagiert (PONTISSO *et al.* 1989b).

Weitergehende Untersuchungen zeigten allerdings, daß bei Tupaiahepatozyten die MA 18/07-Bindestelle wohl doch nicht direkt mit dem bzw. einem HBV-Rezeptor in Wechselwirkung tritt, sondern vielmehr die Bereiche der Aminosäuren 9-18 und 29-48, während die Aminosäuren 1-8 und 19-28 weitgehend entbehrlich sind (GLEBE *et al.* 2005). Damit bindet MA 18/07 zwar nicht in einem Bereich, der für die Bindung des Virus essentiell ist, kann diese Bindung aber dennoch wirkungsvoll inhibieren.

Insgesamt geben diese Ergebnisse Anlaß zu der Annahme, daß sowohl die PräS1-, als auch die S-Domäne des HBsAgs bei der HBV-Infektion primärer Tupaiahepatozyten eine entscheidende Rolle spielen, so wie dies auch bei der HBV-Infektion des Menschen der Fall ist.

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen haben weiterhin ergeben, daß vor allem der hochkonservierten Region Aminosäuren 9-13 innerhalb der PräS1-Domäne eine besondere Bedeutung zukommt. Einerseits kann eine Infektion durch Peptide mit Punktmutationen in diesem Bereich nicht inhibiert werden, andererseits sind Viren mit Punktmutationen in dieser Region nicht infektiös (ENGELKE *et al.* 2006).

Auch die Rolle der S-Domäne bei der primären Bindung des Virus muß kritisch hinterfragt werden. Während unumstritten ist, daß einige Antikörper gegen diese Domäne virusneutralisierend und protektiv sind, zeigen jedoch subvirale Partikel, die ausschließlich aus SHBs bestehen, keinerlei Bindungsverhalten gegenüber lebenden primären Tupaiahepatozyten (GLEBE *et al.* 2005) oder isolierten Plasmamembranen humaner Hepatozyten (PONTISSO *et al.* 1989a). JAOUDÉ und SUREAU (2005) konnten zeigen, daß rekombinante Hepatitis Delta-Viren, deren Virushülle nur aus SHBs besteht, für primäre humane Hepatozyten und HepaRG-Zellen nicht infektiös sind. Bei Viren mit vollständiger Hülle (aus SHBs, MHBs und LHBs) führten allerdings bestimmte Mutationen in der a-Determinante der S-Domäne zu einer deutlichen Reduktion der Infektiosität. Die Autoren schreiben deswegen dem Bereich der Aminosäuren 119-128 eine Funktion bei der Virusinvasion zu, beispielsweise indem diese Determinante mit einem sekundären Rezeptor interagiert und die Virusaufnahme in die Zelle vermittelt, nachdem das Virus über die PräS1-Domäne und einen primären Rezeptor an die Wirtszelle gebunden hat.

Die genaue Rolle der S-Domäne bei der Virusinvasion ist damit weiterhin unklar, fest scheint nur zu stehen, daß sie für die primäre Virus-Zell-Interaktion entbehrlich ist.

4.4. Bindung und Aufnahme von HBsAg

Zahlreiche Studien zu den Infektionsmechanismen von Hepadnaviren deuten darauf hin, daß die Internalisation der Viren durch rezeptorvermittelte Endozytose geschieht. Viele Erkenntnisse wurden dabei durch die Untersuchung der frühen Phasen des Infektionsvorganges bei Avihepadnaviren gewonnen, wobei das Hepatitis B-Virus der Ente (DHBV) am ausführlichsten studiert wurde. Carboxypeptidase D (gp 180) konnte als ein DHBV-Rezeptor identifiziert werden, der mit der PräS-Domäne des großen DHBV-Oberflächenantigens (LDHBs-Antigen) interagiert (u.a. URBAN *et al.* 1998, BREINER *et al.* 1998). Nach der Bindung an den Rezeptor werden DHBV-Partikel endozytotisch aufgenommen, anschließend fusioniert wahrscheinlich die Virushülle mit der Zellmembran (KÖCK *et al.* 1996). Allerdings wird zur Zeit angenommen, daß gp 180 nur das primäre DHBV-Bindeprotein ist, während es noch weiterer Co-Rezeptoren bedarf, um eine Infektion zu etablieren (vgl. BREINER *et al.* 1998, TONG *et al.* 1999). Auch bei den Orthohepadnaviren ist es offenbar so, daß es zu einer Interaktion zwischen der PräS1-Domäne des LHBs und einem zellulären Rezeptor kommt (vgl. u.a. PONTISSO *et al.* 1989a, b, LE SEYEC *et al.* 1999, BARRERA *et al.* 2005, GLEBE *et*

al. 2005). Die Identifizierung des korrespondierenden Rezeptors ist jedoch nach wie vor noch nicht gelungen. Die Interaktion der HBV-Oberflächenproteine mit Hepatozyten wurde auch in dieser Arbeit untersucht. Dazu wurden vor allem primäre Tupaiahepatozyten mit verschiedenen subviralen Partikeln (SVP) inkubiert, und das Bindungs- und Aufnahmeverhalten dieser Partikel beobachtet, unter Zuhilfenahme immunzytochemischer Methoden. Subvirale Partikel bestehen aus SHBs-, MHBs- und LHBs-Proteinen, und entsprechen damit in ihrer Grundstruktur der Virushülle, insbesondere enthalten sie mit dem LHBs auch die PräS1-Domäne. Durch die Verwendung von SVP aus humanem Serum unterscheiden sich die Bindungsversuche in dieser Arbeit ganz wesentlich von denen anderer Arbeitsgruppen, in denen rekombinantes SHBs-Antigen aus Hefe verwendet wurde (DE BRUIN *et al.* 1995), anti-idiotypische Antikörper (MABIT *et al.* 1996), oder Kunststoff-Kügelchen, die mit HBsAg konjugiert wurden (PARAN *et al.* 2003). TREICHEL *et al.* (1997) hingegen benutzten vollständige Viruspartikel aus humanem Serum.

4.4.1 Bindung und Aufnahme von HBsAg durch primäre Tupaiahepatozyten

Der Umstand, daß primäre Tupaiahepatozyten ein Bindungsverhalten für HBsAg zeigen müssen, war im Prinzip naheliegend. Schließlich konnte hier und auch von KÖCK *et al.* (2001) gezeigt werden, daß sie sich mit gereinigtem Hepatitis B-Virus infizieren lassen, was die Möglichkeit ausschließt, daß HBV nur über die Bindung an ein humanes Serumprotein in die Zellen gelangen kann. Also muß das Virus über seine Oberflächenproteine an die Zielzelle in einer solchen Art binden können, daß es auch zu einer Infektion dieser Zelle kommen kann. Eine bildliche Darstellung dieses Vorgangs existierte bislang jedoch noch nicht, zumindest nicht im Falle primärer Tupaiahepatozyten. Die Bindung und Aufnahme von rekombinantem SHBs-Antigen wurde jedoch schon in primären humanen Hepatozyten dargestellt (DE BRUIN *et al.* 1995). In dieser Arbeit wurde nun erstmals die Bindung und Aufnahme unterschiedlicher, vollständiger subviraler Partikel aus humanem Spenderserum durch primäre Tupaiahepatozyten direkt dargestellt.

4.4.1.1 Bindung und Aufnahme von nativem HBsAg

Wie in Kapitel 3.4.1.1 beschrieben, konnte hier gezeigt werden, daß etwa 70% der Tupaiahepatozyten in den Zellkulturen die Fähigkeit zur Bindung von HBsAg haben. Dieser hohe Anteil war zunächst überraschend, da sich in den Infektionsexperimenten nur ein wesentlich geringerer Anteil von Zellen (bis maximal ca. 4%) mit HBV infizieren ließ. Auch stellte sich in den Bindungsversuchen dar, daß auch solitär liegende Hepatozyten subvirale Partikel binden und aufnehmen können, während eine Infektion gerade dieser Zellen jedoch nie dargestellt werden konnte. Generell ließ sich kein morphologischer oder topographischer Unterschied erkennen zwischen solchen Zellen, die HBsAg binden konnten, und solchen, die kein solches Bindungsverhalten zeigten. Von welchen äußeren Bedingungen die Bindungsfähigkeit der primären Tupaiahepatozyten für HBsAg abhängt, konnte in dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Allerdings kann man aus diesen Bindungsversuchen den Schluß ziehen, daß bei weitem nicht alle Zellen, die in der Lage sind, HBsAg zu binden und aufzunehmen, auch mit HBV infizierbar sind. Diese Überlegung wird noch durch die Beobachtung untermauert, daß auch solche Zellen ein Bindungsverhalten für HBsAg zeigen, die generell nicht suszeptibel für eine HBV-Infektion sind (siehe Kap. 4.4.2). Diese Ergebnisse sind am ehesten mit einer Multi-Rezeptor-Hypothese der HBV-Infektion vereinbar: Während viele Zellen, auch niedriger differenzierte, einen Rezeptor aufweisen, an den Hepatitis B-Viren binden können, fehlt einem Großteil dieser Zellen ein weiterer Rezeptor, durch den erst eine Fusion der Virushülle mit der Zellmembran, und nachfolgend eine Infektion ermöglicht wird. Dieser Rezeptor wird offenbar nur von höher differenzierten Zellen exprimiert, wie zum Beispiel von primären Tupaiahepatozyten, die in einem größeren Zellverband liegen. Welche Rezeptoren für die Virusbindung einerseits, und Vermittlung der Membranfusion andererseits in Frage kommen, verbleibt an dieser Stelle noch unklar. Von zahlreichen anderen Autoren wurde bereits verschiedensten Rezeptoren und anderen Proteinen die Fähigkeit zur Bindung von HBsAg zugesprochen, im einzelnen sind dies: Der Albuminrezeptor, der Transferrinrezeptor (CD 71), der IgA-Rezeptor, der LDL-Rezeptor, der Asialoglykoproteinrezeptor (ASGPR), der Interleukin-6-Rezeptor, Endonexin-2, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPD), sowie zwei noch unbekannte Proteine mit 31 bzw. 50 kD Molekulargewicht (vgl. TREICHEL *et al.* 1997, DE MEYER *et al.* 1997). Weiterhin ist noch unklar, ob diejenigen Proteine, an die HBsAg bindet, bei Mensch und Tupaia die gleichen, bzw. einander äquivalente sind. In dieser Arbeit konnte lediglich gezeigt

werden, daß der Transferrinrezeptor des Tupaia entweder *in vitro* nicht exprimiert wird, oder aber sich soweit vom seinem humanen Äquivalent unterscheidet, daß weder humanes Transferrin, noch ein Antikörper gegen den humanen Transferrinrezeptor daran bindet (vgl. Kap.4.2.2 b). Ob der tupaine Transferrinrezeptor als HBV-Bindeprotein in Frage kommt, muß daher zumindest kritisch hinterfragt werden.

Zur weiteren Untersuchung der Rolle des ASGPRs bei der Bindung und Aufnahme von HBsAg siehe Kap. 4.4.1.5.

Alternativ käme in Betracht, daß es zwar in vielen Zellen zur Invasion des Virus kommt, aber ein darauf folgender Schritt des Infektionsablaufs gestört ist, zum Beispiel die Fusion von Virus- und Zellmembran und Freisetzung des Cores, der Transport des Cores zum Zellkern, oder die Freisetzung des Virusgenoms aus dem Core. Da auch diese frühen Schritte der HBV-Infektion noch längst nicht vollständig erforscht sind, sind noch weitere Untersuchungen notwendig, um diese Frage zu klären.

4.4.1.2 Differenzierung zwischen Bindung und Aufnahme von HBsAg

Wie in Kapitel 3.4.1.2 beschrieben, ist es gelungen, selektiv denjenigen Anteil des HBsAg darzustellen, der von den primären Tupaiahepatozyten nur oberflächlich gebunden wurde. Dabei zeigte sich gegenüber den sonstigen Bindungs- und Aufnahmeversuchen ein wesentlicher Unterschied in der Verteilung des HBsAg über die unterschiedlichen Regionen der Zellen. Da sich gebundenes HBsAg ausschließlich in der Zellperipherie darstellt, ist davon auszugehen, daß solches HBsAg, welches sich in zentraleren Regionen des Zellkörpers darstellt, sich innerhalb der Zelle befindet, also aufgenommen wurde (Abb. 4-4.1). Es konnte hier allerdings nicht geklärt werden, in welchen Kompartimenten sich das intrazellulär zur Darstellung kommende HBsAg befindet, ob in Endosomen, Endolysosomen, im Zytosol oder anderswo. Auffallend war lediglich die Anhäufung in bestimmten Zellregionen. Gebundenes HBsAg stellte sich oft besonders deutlich an peripheren Zellfortsätzen dar, was vermuten läßt, daß dort die Dichte der HBV-Bindeproteine besonders hoch ist (Abb. 4-4.1 A). Aufgenommenes HBsAg stellte sich in einigen Zellen als großes Konglomerat in Nähe des Zellkerns dar, in anderen Zellen hingegen mehr oder weniger homogen im gesamten Zytoplasma (Abb. 4-4.1 B+C). Der Grund für diese unterschiedlichen Verteilungsmuster ist unklar; eventuell entsprechen sie unterschiedlichen Mechanismen der Aufnahme über unterschiedliche Rezeptoren, aus denen die Ansammlung des HBsAg in verschiedenen Zellkompartimenten resultiert. Oder aber sie spiegeln unterschiedliche Phasen im

zeitlichen Verlauf des Aufnahmeprozesses wider, der von der Zellperipherie zum Zentrum hin verläuft. In diesen Prozeß könnten auch mehrere verschiedene Kompartimente involviert sein. Weiterführende Untersuchungen sind hier sicherlich noch notwendig, zum Beispiel mittels konfokaler Laser-scanning Mikroskopie, Transmissions-Elektronenmikroskopie oder der selektiven Blockierung verschiedener Wege der Endozytose.

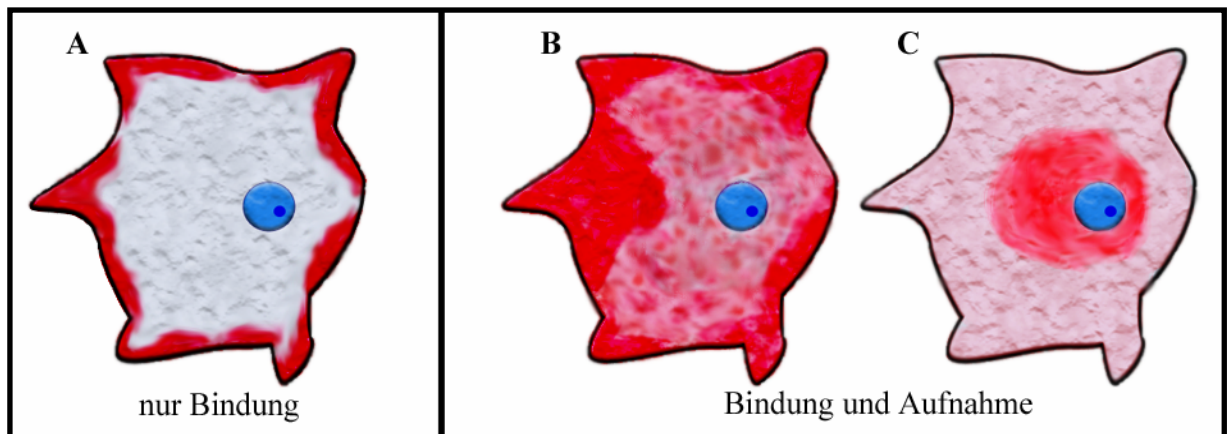


Abb. 4-4.1: Schematische Darstellung der beobachteten Verteilungen von HBsAg (rot) an bzw. in primären Tupaiahepatozyten bei immunzytochemischer Darstellung.

A: Eine ausschließlich periphere Verteilung findet sich bei der selektiven Darstellung des oberflächlich gebundenen HBsAg (4°C-Bindung bzw. Nicht-Permeabilisierung).

B, C: Bei der „konventionellen“ Darstellung des gesamten Zell-assoziierten HBsAg (Inkubation bei 37°C, Permeabilisierung) stellt sich häufig eine Verteilung dar, die sich über den gesamten Zellkörper erstreckt, und mehr oder weniger zentrale Zonen verstärkter Ansammlung aufweist. Auffallend ist die häufig erhöhte HBsAg-Dichte an peripheren Zellfortsätzen (**A, B**).

4.4.1.3 Verbleib des aufgenommenen HBsAg

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht nur gezeigt werden, daß in primären Tupaiahepatozyten HBsAg nachgewiesen werden kann, wenn sie mit subviralen Partikeln inkubiert wurden, sondern auch, daß die Nachweisbarkeit des HBsAg nur in einem begrenzten Zeitraum nach Inkubationsende möglich ist. Bereits nach zwei Stunden ist aufgenommenes HBsAg nicht mehr intrazellulär nachweisbar, was mehrere mögliche Ursachen haben kann. So könnte das HBsAg, in einer Art Transzytose, wieder ausgeschleust werden, ohne daß es intrazellulär prozessiert wurde. Oder aber es könnte, zum Beispiel innerhalb eines Endolysosoms, enzymatisch vollständig degradiert, respektive soweit modifiziert werden, daß es in der Immunzytochemie vom Primärantikörper nicht mehr erkannt wird. Jedenfalls scheint das HBsAg nicht unverändert in den Zellen gespeichert zu werden.

Bezüglich des Verbleibs von aufgenommenem HBsAg existieren nur wenige Studien. PEPE *et al.* (1979) haben die Aufnahme von HBsAg durch Makrophagen genauer untersucht, und dabei festgestellt, daß in diesen Zellen HBsAg erst ca. 3 Stunden nach Beginn der Inkubation mit HBsAg-haltigem Medium nachweisbar wird, und die Nachweisbarkeit innerhalb von 24 - 48 h langsam nachläßt. Sie führen dies vor allem darauf zurück, daß das HBsAg in den Makrophagen degradiert wird. Natürlich sind Makrophagen schon allein wegen ihrer Funktion als „Freßzellen“ nicht mit Hepatozyten vergleichbar; dennoch läßt sich schon allein durch die stark unterschiedlichen Zeitverläufe der Nachweisbarkeit des HBsAg vermuten, daß sich die Aufnahme und intrazelluläre Prozessierung von HBsAg in diesen beiden Zelltypen grundlegend unterscheidet.

Was genau mit aufgenommenem HBsAg in Hepatozyten geschieht, verbleibt noch zu eruieren. Jedenfalls kann hier, im Hinblick auf die oben beschriebenen Infektionsversuche, Folgendes gesagt werden: Bei dem HBsAg, welches in diesen Versuchen intrazellulär nachgewiesen wurde, kann es sich nicht um Hüllproteine aus dem Virus-Inokulat handeln, die von den Zellen aufgenommen und gespeichert wurden. Das während der Inkubation mit dem Virus-Inokulat aufgenommene HBsAg wäre zum Zeitpunkt der Fixierung der Zellen (6 - 12 Tage später) nämlich gar nicht mehr nachweisbar gewesen. Also muß es sich um neu gebildetes HBsAg handeln, was in diesem Fall eine erfolgreiche Infektion der primären Tupaiahepatozyten mit HBV beweist.

4.4.1.4 Inhibition der Bindung von HBsAg an primäre Tupaiahepatozyten

Unter der Annahme, daß die Bindung und Aufnahme von HBsAg durch primäre Tupaiahepatozyten rezeptorvermittelt abläuft, müßte dieser Prozeß durch die spezifische Blockierung der Ligand-Rezeptor-Interaktion inhibierbar sein.

a) *Inhibition durch Antikörper.* Wie in Kapitel 4.3.4 beschrieben, konnte zunächst gezeigt werden, daß die Infektion primärer Tupaiahepatozyten mit HBV durch polyklonale Antikörper inhibiert werden kann, die vor allem gegen das SHBs-Protein gerichtet sind, aber auch gegen MHBs und LHBs. Polyklonale Antikörper gegen SHBs spielen auch eine fundamentale Rolle in der humanmedizinischen Impfpraxis, da viele der heutzutage gebräuchlichen HBV-Impfstoffe nur SHBs-Proteine enthalten. Hier konnte nun zusätzlich nachgewiesen werden, daß die schützende Wirkung dieser

Antikörper darauf beruht, daß sie die Bindung der Viren an die Hepatozyten verhindern. Die möglichen Gründe hierfür sind vielfältig: Zum einen könnte es zur Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen kommen, die von den Zellen nicht gebunden werden können. Zum anderen könnte es sein, daß der Antikörper genau in der Region des HBsAg bindet, die mit dem Rezeptor interagiert. Daß vor allem das LHBs eine Schlüsselrolle bei der Bindung an die Zielzelle spielt, wird nicht nur von vielen anderen Autoren angenommen, sondern konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden. Eine Beteiligung des SHBs an diesem Vorgang kann aber nicht völlig ausgeschlossen werden. Alternativ könnte der Antikörper auch außerhalb der Rezeptor-Bindungsstelle binden, und es allein durch seine störende räumliche Struktur unmöglich werden lassen, daß das HBsAg mit seinem zellulären Rezeptor in Kontakt gerät. Dies ist hier die wahrscheinlichste Möglichkeit, da QIAO *et al.* (1994) bereits an HepG2-Zellen zeigen konnten, daß die Bindung von HBsAg an diese Zellen nur durch den vollständigen Anti-HBs-Antikörper inhibiert werden kann, nicht aber durch dessen Fab-Fragmente allein. Allerdings konnten sie auch zeigen, daß die Fab-Fragmente des monoklonalen Anti-PräS1-Antikörpers MA 18/07 die Bindung des HBsAg verhindern können.

Wie bereits in Kapitel 4.3.4 dargelegt, liegt die MA 18/07-Bindestelle zwar offenbar nicht genau in derjenigen PräS1-Region, welche die Bindung des Virus an die Zelle vermittelt, jedoch dicht daran angrenzend. Daher wäre es denkbar, daß durch die Bindung von Fab-Fragmenten an dieses Epitop die direkt benachbarte PräS1-Region an der Interaktion mit dem zellulären Rezeptor gehindert wird.

In dieser Arbeit konnten Versuche zur Inhibition der HBsAg-Bindung durch MA 18/07 nicht durchgeführt werden, da sich zeigte, daß MA 18/07 an native Tupaiahepatozyten bindet, und nachfolgend in der Immunzytochemie zu einer falsch-positiven Färbung führt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine Experimente durchgeführt, die darauf abgezielt hätten, einen putativen HBV-Rezeptor auf den Tupaiahepatozyten durch einen Antikörper zu blockieren. Die Verwendung von Antikörpern gegen den humanen ASGPR oder Transferrinrezeptor, zwei der putativen Rezeptoren, erübrigte sich schon allein deswegen, weil diese Antikörper nicht an Tupaiahepatozyten banden (siehe Kap. 4.2.2). TREICHEL *et al.* (1994) berichteten, daß sie die Bindung von HBV an HepG2- und HuH7-Zellen mit einem Antikörper gegen den ASGPR inhibieren konnten; um diese Experimente an primären Tupaiahepatozyten nachvollziehen zu können, müßte zunächst ein Antikörper gegen den tupainen ASGPR zur Verfügung stehen.

b) Inhibition durch myristoylierte PräS1-Peptide: In den hier durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, daß die Bindung von HBsAg an primäre Tupaiahepatozyten durch ein myristoyliertes PräS1-Peptid (HuPreS2-48^{myr}) drastisch reduziert werden kann, während das PräS-Peptid des DHBV (DuPreS2-41^{myr}) dazu nicht in der Lage ist. Dies läßt darauf schließen, daß HuPreS2-48^{myr} spezifisch an denjenigen Rezeptor bindet, an den auch die subviralen Partikel respektive das Hepatitis B-Virus binden würden, und damit die Bindung des HBsAg kompetitiv inhibiert. Da das synthetische Peptid dem aminoterminalen Teil der PräS1-Domäne des LHBs-Proteins entspricht, muß sich dort eine bedeutende Bindungsstelle für den putativen HBV-Rezeptor befinden. Die Inhibition der Bindung durch HuPreS2-48^{myr} war offenbar nicht vollständig möglich, was aber auch nicht zu erwarten war, da es sich hier um einen kompetitiven Inhibitionsmechanismus handelt. Während eine Bindung von HBs-Sphären gar nicht mehr immunzytochemisch nachgewiesen werden konnte, zeigte sich jedoch immer noch eine schwache Bindung von Filamenten (siehe Abb. 3-4.7). Dies ist damit zu erklären, daß Filamente einen höheren Anteil an LHBs haben als Sphären, und deshalb durch das PräS1-Peptid schlechter zu inhibieren sind. Wahrscheinlich verhält es sich auch bei den Sphären so, daß ein kleiner Anteil von ihnen an die Tupaiahepatozyten binden kann, dies aber nicht ausreicht, um immunzytochemisch dargestellt werden zu können.

Hierzu äquivalente Ergebnisse haben URBAN und GRIPON (2002) erhalten, die gezeigt haben, daß sich die DHBV-Infektion primärer Entenhepatozyten durch ein myristoyliertes PräS-Peptid des DHBV kompetitiv inhibieren läßt. Auch dort ließ sich keine vollständige Inhibition der Infektion erreichen, aber immerhin eine Reduktion um mehr als 90%. Wie bereits erwähnt, ist bekannt, daß DHBV über die PräS-Domäne an einen seiner Rezeptoren bindet.

Ob auch die HBV-Infektion primärer Tupaiahepatozyten durch HuPreS2-48^{myr} signifikant inhibiert werden kann, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden. In weitergehenden Experimenten der Arbeitsgruppe konnte allerdings gezeigt werden, daß dies durchaus der Fall ist (GLEBE *et al.* 2005).

Weiterhin konnten GRIPON *et al.* (2005) zeigen, daß auch die Infektion von primären humanen Hepatozyten und HepaRG-Zellen durch myristoylierte PräS1-Peptide spezifisch inhibiert werden kann.

4.4.1.5 Bindung / Aufnahme von desialylierten subviralen Partikeln durch primäre Tupaiahepatozyten

Zwischen der Bindung und Aufnahme nativer oder desialylierter subviraler Partikel durch primäre Tupaiahepatozyten ließ sich kein wesentlicher Unterschied feststellen. Dies bedeutet, daß hierfür das exakte und unveränderte Glykosylierungsmuster des HBsAg nicht zwingend notwendig ist. Prinzipiell besteht die Möglichkeit, daß desialylierte Proteine über den ASGPR aufgenommen werden. Eine quantitativ bedeutsame Aufnahme desialylierter subviraler Partikel über den ASGPR konnte hier jedoch praktisch ausgeschlossen werden, da sie sich nicht durch einen großen Überschuß an anderen ASGPR-Liganden inhibieren ließ. Dies gibt Grund zu der Annahme, daß der ASGPR bei der HBV-Infektion primärer Tupaiahepatozyten keine wesentliche Rolle spielt, und damit wahrscheinlich auch nicht bei der HBV-Infektion des Menschen. Dieser Befund steht scheinbar in Widerspruch zu den Berichten von TREICHEL *et al.* (1994 u. 1997) und OWADA *et al.* (2006), die auf Grund ihrer Beobachtungen den ASGPR als Rezeptor für HBV deklariert hatten. Deren Ergebnisse stützten sich jedoch unter anderem auf die Untersuchung der Bindung von HBsAg an HepG2- und HuH7-Zellen, die sie durch den ASGPR-Liganden Asialofetuin inhibieren konnten. OWADA *et al.* (2006) berichten zwar von einer Infektion von HepG2-Zellen mit desialylierten Hepatitis B-Virionen, welche sich durch Asialofetuin dosisabhängig inhibieren ließ; allerdings kann in dieser Arbeit eine wirkliche Infektion der HepG2-Zellen nicht überzeugend aufgezeigt werden. Einerseits fehlen Nachweise für neu synthetisiertes HBsAg und HBeAg oder virale mRNA. Andererseits nimmt die Konzentration der 24 h nach Infektion nachgewiesenen cccDNA im weiteren Verlauf immer mehr ab, und ist bereits sechs Tage später nicht mehr detektierbar, was gegen eine Infektion spricht.

An dieser Stelle muß man nun auf der einen Seite bedenken, daß HepG2- (und HuH7-) Zellen zwar HBsAg binden und aufnehmen können, sie aber nach vorherrschender Meinung nicht suszeptibel für eine HBV-Infektion sind, im Gegensatz zu primären Tupaiahepatozyten. Das bedeutet eventuell, daß HepG2-Zellen zwar durchaus über den ASGPR HBsAg bzw. HBV-Partikel internalisieren können, daß dieser Weg der Aufnahme jedoch nicht zu einer Infektion führt. Möglicherweise stellt hier der ASGPR eine Art „Alternativ-Rezeptor“ dar, der nur in Abwesenheit des originären HBV-Rezeptors in ausreichender Menge HBsAg binden kann, weil er eine relativ schwächere Affinität zum HBsAg hat. Bei primären Tupaiahepatozyten könnte es hingegen

eventuell so sein, daß sie zwar über den ASGPR HBsAg aufnehmen könnten, es aber nicht in einem relevanten Maß tun, weil die Affinität des HBsAg zum „eigentlichen“ HBV-Rezeptor wesentlich höher ist als zum ASGPR. Auf der anderen Seite könnte es natürlich auch so sein, daß die HBV-Infektion primärer Tupaiahepatozyten über einen anderen Rezeptor vermittelt wird, als diejenige des Menschen. So könnte es sein, daß beim Menschen eventuell der ASGPR wirklich der primäre HBV-Rezeptor ist, und in HepG2-Zellen ein anderer Schritt des Infektionsvorganges, jenseits der Virus-Invasion, gestört ist.

Um diese Fragen mit Sicherheit beantworten zu können, müssen sowohl beim Menschen, als auch beim Tupaia die frühen Phasen der HBV-Infektion noch weiter studiert, und vor allem die beteiligten Rezeptoren identifiziert werden.

4.4.1.6 Bindung / Aufnahme trypsinierter und V8-verdauter subviraler Partikel

Durch die Behandlung der subviralen Partikel mit den Proteasen Trypsin bzw. V8 wurde von ihrer Oberfläche die gesamte PräS1-Domäne, sowie große Teile der PräS2-Domäne entfernt. Wie jedoch in den vorhergehenden Versuchen gezeigt wurde, wird die Bindung von HBsAg an primäre Tupaiahepatozyten im Wesentlichen durch die PräS1-Domäne vermittelt. So hätte man erwarten können, daß die Protease-behandelten SVP nicht mehr von den Tupaiahepatozyten gebunden und aufgenommen werden können. Dies war jedoch nicht der Fall; beide Arten der modifizierten SVP wurden mit vergleichbarer Intensität aufgenommen wie native SVP. Dieses Phänomen läßt sich folgendermaßen erklären: Es wird angenommen, daß sich im Bereich zwischen der S- und der PräS2-Domäne des HBsAg eine „Fusionssequenz“ befindet, die durch die Einwirkung von Trypsin oder V8 freigelegt wird. Die freigelegte Fusionssequenz kann wahrscheinlich eine Fusion der Virushülle, in diesem Falle der subviralen Partikel, mit der Zellmembran der Zielzelle bewirken (vgl. GERLICH u. HEERMANN 1991, LU *et al.* 1996, BERTING *et al.* 2000). Die Bindung und konsekutive Aufnahme des modifizierten HBsAg würde so völlig unabhängig von der PräS1-Domäne und dem putativen zellulären Rezeptor erfolgen.

Einen Hinweis auf einen verändert ablaufenden Aufnahmemechanismus der Protease-behandelten SVP gegenüber nativen SVP ergibt sich aus der näheren Betrachtung des intrazellulären Verteilungsmusters des HBsAg nach der Aufnahme. Im Gegensatz zu nativen SVP stellten sich die modifizierten auffallend häufig als großes Konglomerat dar, das den Zellkern direkt umschloß, und waren nur sehr selten an der

Plasmamembran oder diffus im gesamten Zytoplasma lokalisiert. Bei den nativen SVP überwogen die beiden letztgenannten Verteilungstypen deutlich gegenüber einer stark ausgeprägten perinukleären Akkumulation (vgl. Abb. 3-4.13).

In dieser Arbeit konnte zudem dargestellt werden, daß die Bindung und Aufnahme der trypsinierten SVP auch dann erfolgt, wenn sie desialyliert wurden. Auch dieser Vorgang erscheint unabhängig zu sein vom ASGPR, da er durch einen ASGPR-Liganden nicht kompetitiv inhibiert werden konnte.

Ob die hier artifiziell freigelegte Fusionssequenz auch bei dem natürlich ablaufenden Infektionsvorgang eine Rolle spielt, ist noch völlig unklar.

4.4.2. Bindung und Aufnahme von HBsAg durch HepG2-Zellen

Die Tatsache, daß HepG2-Zellen HBsAg aufnehmen können, war an sich schon seit längerem bekannt (u.a. TREICHEL *et al.* 1997, QIAO *et al.* 1994). Im Gegensatz zu anderen Arbeiten wurde hier jedoch die Fähigkeit von HepG2-Zellen, HBsAg aufzunehmen, im integeren Zellverband direkt auf dem Objektträger immunzytochemisch dargestellt. Dies erlaubt den direkten Vergleich mit den übrigen hier durchgeführten Bindungsversuchen, insbesondere was die intrazelluläre Lokalisation des aufgenommenen HBsAg betrifft. In den Bindungsversuchen mit HepG2-Zellen fiel auf, daß sich in diesen Zellen das aufgenommene HBsAg fast immer als großes, rundliches Konglomerat darstellte, welches dem Zellkern anlag (siehe Abb. 3-4.14). Praktisch nie konnte eine Bindung des HBsAg in der Zellperipherie dargestellt werden, oder eine diffuse Verteilung über das gesamte Zytoplasma, wie dies bei primären Tupaiahepatozyten überwiegend der Fall war. Dies könnte darauf hindeuten, daß die Aufnahme von HBsAg in HepG2-Zellen anders verläuft als in primären Tupaiahepatozyten, und daß es nach der Aufnahme in jeweils unterschiedliche Kompartimente der Zellen transportiert wird.

Unter Berücksichtigung vor allem der in Kapitel 4.4.1.5 genannten Punkte kann man zusammenfassend sagen, daß einige Punkte darauf hindeuten, daß sich der Mechanismus der Bindung und Aufnahme von HBsAg in HepG2-Zellen und primären Tupaiahepatozyten unterscheidet. Welche Art und Weise der Aufnahme am ehesten mit den Vorgängen vereinbar ist, die bei der spontanen HBV-Infektion des Menschen ablaufen, verbleibt zu eruieren.

5. Zusammenfassung

Infektionen mit dem Hepatitis B-Virus spielen in der Humanmedizin weltweit eine bedeutende Rolle. Obwohl schon seit den 1960er Jahren bekannt, waren Studien zum Infektionsvorgang von HBV lange Zeit nur sehr eingeschränkt möglich, da es an einem praktikablen Infektionssystem mangelte. Diesbezüglich stellte die Entdeckung der Suszeptibilität von Tupaiahepatozyten für HBV *in vivo* und *in vitro* einen enormen Fortschritt dar.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die frühen Phasen der HBV-Infektion in einem *in vitro*-System mit primären Tupaiahepatozyten untersucht. Der biologische Funktions- bzw. Differenzierungszustand der Zellen in diesem System konnte an Hand von Oberflächenrezeptoren und Zytoskelettfilamenten genauer charakterisiert werden. Es wurde klar, daß diesbezüglich innerhalb einer Zellkultur eine gewisse Heterogenität besteht, die im Zusammenhang mit einer unterschiedlichen Infizierbarkeit der Zellen mit HBV stehen könnte.

Es konnte gezeigt werden, daß bestimmte Populationen primärer Tupaiahepatozyten als Zeichen einer HBV-Infektion *de novo* HBsAg synthetisieren, und daß das intrazelluläre Verteilungsmuster des HBsAg weitgehend mit dem übereinstimmt, welches bei der akuten HBV-Infektion des Menschen beobachtet werden kann.

Weiterhin wurde dargestellt, daß HBsAg in Form von subviralen Partikeln spezifisch an Tupaiahepatozyten bindet, und von diesen aufgenommen wird. Diese Vorgänge konnten durch Anti-HBs-Antikörper und PräS1-Peptide inhibiert werden. Damit wurde gezeigt, daß die PräS1-Domäne bei der Bindung von HBsAg an Hepatozyten eine wesentliche Rolle spielt. Zwar konnten subvirale Partikel auch noch nach weitgehender Entfernung der PräS-Domänen aufgenommen werden, jedoch ergaben sich Hinweise dafür, daß diesem Aufnahmeprozess ein anderer Mechanismus zu Grunde liegt.

Viele Aspekte der frühen Phasen der HBV-Infektion bleiben nach wie vor unklar, und bedürfen weiterer Untersuchungen. Insbesondere konnte der HBV-Rezeptor oder HBV-Rezeptorkomplex noch nicht zweifelsfrei identifiziert werden.

Durch diese Arbeit konnte die Eignung primärer Tupaiahepatozyten für derartige Untersuchungen bestätigt, und einige Aspekte dieses Modellsystems für die HBV-Infektion genauer charakterisiert werden.

5. Summary

Infections with hepatitis B virus (HBV) play an important role in human medicine worldwide. Although it has already been discovered in the 1960s, studies regarding the infection process of HBV have been strongly limited by the lack of a practicable infection system. Concerning this, the discovery that primary hepatocytes from the tree shrew *Tupaia belangeri* are susceptible to HBV infection *in vivo* and *in vitro* represented an enormous improvement.

In this work, the early steps of HBV infection were analysed in an *in vitro* system using primary tupaia hepatocyte cultures. The biological state of function and differentiation of the cells in this infection system could be characterised more precisely by the investigation of surface receptors and cytoskeletal filaments. It became clear that in this regard there is a certain heterogeneity within the cell culture, that is connected with a different susceptibility of cells to HBV.

It could be shown that after inoculation with HBV, certain populations of primary tupaia hepatocytes synthesise hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) *de novo* as a sign of HBV infection, and that the intracellular distribution pattern of HBsAg is quite similar to that one that can be observed during acute HBV infection in human liver.

Furthermore, it could be shown that HBsAg in form of subviral particles specifically attaches to primary tupaia hepatocytes, and that it is also taken up by those cells. These processes could be inhibited by anti-HBs antibodies as well as by preS1 peptides.

These results demonstrate that the preS1 domain plays an important role in the attachment of HBsAg to primary tupaia hepatocytes. Although subviral particles could still be taken up after enzymatic removal of major parts of the preS domains, there were indications for a different mechanism underlying this particular uptake process.

In this work, the suitability of primary tupaia hepatocytes for the investigation of the HBV infection process could be confirmed, and some aspects of this model of HBV infection could be characterised more precisely.

However, many aspects of the early phases of HBV infection still remain unclear, and need further investigation.

6. Literaturverzeichnis

1. Epidemiologisches Bulletin Nr. 37, Robert-Koch-Institut, 10.09.2004.
2. **Acs G., Sells M. A., Purcell R. H., Price P., Engle R., Shapiro M., Popper H.:** Hepatitis B virus produced by transfected Hep G2 cells causes hepatitis in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. 84(13), S. 4641-4.
3. **Aden D. P., Fogel A., Plotkin S., Damjanov I., Knowles B. B.:** Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, 1979. 282(5739), S. 615-6.
4. **Aldwinckle T. J., Ahkong Q. F., Bangham A. D., Fisher D., Lucy J. A.:** Effects of poly(ethylene glycol) on liposomes and erythrocytes. Permeability changes and membrane fusion. *Biochim Biophys Acta*, 1982. 689(3), S. 548-60.
5. **Alison M., Golding M., Lalani E. N., Nagy P., Thorgeirsson S., Sarraf C.:** Wholesale hepatocytic differentiation in the rat from ductular oval cells, the progeny of biliary stem cells. *J Hepatol*, 1997. 26(2), S. 343-52.
6. **Arikura J., Kobayashi N., Okitsu T., Noguchi H., Totsugawa T., Watanabe T., Matsumura T., Maruyama M., Kosaka Y., Tanaka N., Onodera K., Kasai S.:** UW solution: a promising tool for cryopreservation of primarily isolated rat hepatocytes. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2002. 9(6), S. 742-9.
7. **Arterburn L. M., Zurlo J., Yager J. D., Overton R. M., Heifetz A. H.:** A morphological study of differentiated hepatocytes in vitro. *Hepatology*, 1995. 22(1), S. 175-87.
8. **Barrera A., Guerra B., Notvall L., Lanford R. E.:** Mapping of the hepatitis B virus pre-S1 domain involved in receptor recognition. *J Virol*, 2005. 79(15), S. 9786-98.
9. **Bartholomeusz A., Schaefer S.:** Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *Rev Med Virol*, 2004. 14(1), S. 3-16.

10. **Baust J. M., Van B., Baust J. G.:** Cell viability improves following inhibition of cryopreservation-induced apoptosis. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2000. 36(4), S. 262-70.
11. **Becker S., Spiess M., Klenk H. D.:** The asialoglycoprotein receptor is a potential liver-specific receptor for Marburg virus. *J Gen Virol*, 1995. 76 (Pt 2), S. 393-9.
12. **Ben Abdennebi H., Steghens J. P., Hadj-Aissa A., Barbieux A., Ramella-Virieux S., Gharib C., Boillot O.:** A preservation solution with polyethylene glycol and calcium: a possible multiorgan liquid. *Transpl Int*, 2002. 15(7), S. 348-54.
13. **Ben-Ze'ev A., Robinson G. S., Bucher N. L., Farmer S. R.:** Cell-cell and cell-matrix interactions differentially regulate the expression of hepatic and cytoskeletal genes in primary cultures of rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(7), S. 2161-5.
14. **Berry M. N., Edwards, A.M., Barrit, G.J.:** Isolated Hepatocytes. Preparation, Properties and Applications. *In: Burdon R. H., van Knippenberg, P.H.: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 21., 1. Aufl.* 1991. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford.
15. **Berting A., Fischer C., Schaefer S., Garten W., Klenk H. D., Gerlich W. H.:** Hemifusion activity of a chimeric influenza virus hemagglutinin with a putative fusion peptide from hepatitis B virus. *Virus Res*, 2000. 68(1), S. 35-49.
16. **Bhatia S. N., Balis U. J., Yarmush M. L., Toner M.:** Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells. *Faseb J*, 1999. 13(14), S. 1883-900.
17. **Bischoff J., Lodish H. F.:** Two asialoglycoprotein receptor polypeptides in human hepatoma cells. *J Biol Chem*, 1987. 262(24), S. 11825-32.
18. **Biswas R., Gerlich W., Schober A., Thomssen R.:** Bestimmung der Antikörper gegen Subtypen des Hepatitis-B-Oberflächenantigens (HBsAg). *Zentralbl Bakteriol [Orig A]*, 1976. 235(1-3), S. 310-5.

19. **Blaheta R. A., Kronenberger B., Woitaschek D., Auth M. K., Scholz M., Weber S., Schuldes H., Encke A., Markus B. H.:** Dedifferentiation of human hepatocytes by extracellular matrix proteins in vitro: quantitative and qualitative investigation of cytokeratin 7, 8, 18, 19 and vimentin filaments. *J Hepatol*, 1998. 28(4), S. 677-90.
20. **Bleul C. C., Wu L., Hoxie J. A., Springer T. A., Mackay C. R.:** The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(5), S. 1925-30.
21. **Blumberg B. S., Alter H. J., Visnich S.:** A "New" Antigen in Leukemia Sera. *Jama*, 1965. 191, S. 541-6.
22. **Blumberg B. S., Gerstley B. J., Hungerford D. A., London W. T., Sutnick A. I.:** A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med*, 1967. 66(5), S. 924-31.
23. **Breiner K. M., Urban S., Schaller H.:** Carboxypeptidase D (gp180), a Golgi-resident protein, functions in the attachment and entry of avian hepatitis B viruses. *J Virol*, 1998. 72(10), S. 8098-104.
24. **Bruns M., Miska S., Chassot S., Will H.:** Enhancement of hepatitis B virus infection by noninfectious subviral particles. *J Virol*, 1998. 72(2), S. 1462-8.
25. **Chesne C., Guyomard C., Fautrel A., Poullain M. G., Fremond B., De Jong H., Guillouzo A.:** Viability and function in primary culture of adult hepatocytes from various animal species and human beings after cryopreservation. *Hepatology*, 1993. 18(2), S. 406-14.
26. **Coates T., Wilson R., Patrick G., Andre F., Watson V.:** Hepatitis B vaccines: assessment of the seroprotective efficacy of two recombinant DNA vaccines. *Clin Ther*, 2001. 23(3), S. 392-403.
27. **Dandri M., Burda M. R., Gocht A., Torok E., Pollok J. M., Rogler C. E., Will H., Petersen J.:** Woodchuck hepatocytes remain permissive for hepadnavirus infection and mouse liver repopulation after cryopreservation. *Hepatology*, 2001. 34(4 Pt 1), S. 824-33.

28. **Dandri M., Burda M. R., Zuckerman D. M., Wurstthorn K., Matschl U., Pollok J. M., Rogiers X., Gocht A., Kock J., Blum H. E., von Weizsacker F., Petersen J.:** Chronic infection with hepatitis B viruses and antiviral drug evaluation in uPA mice after liver repopulation with tupaia hepatocytes. *J Hepatol*, 2005. 42(1), S. 54-60.
29. **Dane D. S., Cameron C. H., Briggs M.:** Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*, 1970. 1(7649), S. 695-8.
30. **De Bruin W. C., Hertogs K., Leenders W. P., Depla E., Yap S. H.:** Hepatitis B virus: specific binding and internalization of small HBsAg by human hepatocytes. *J Gen Virol*, 1995. 76 (Pt 4), S. 1047-50.
31. **De Loecker R., Fuller B. J., Gruwez J., De Loecker W.:** The effects of cryopreservation on membrane integrity, membrane transport, and protein synthesis in rat hepatocytes. *Cryobiology*, 1990. 27(2), S. 143-52.
32. **De Meyer S., Gong Z. J., Suwandhi W., van Pelt J., Soumillion A., Yap S. H.:** Organ and species specificity of hepatitis B virus (HBV) infection: a review of literature with a special reference to preferential attachment of HBV to human hepatocytes. *J Viral Hepat*, 1997. 4(3), S. 145-53.
33. **Deepen R., Heermann K. H., Uy A., Thomssen R., Gerlich W. H.:** Assay of preS epitopes and preS1 antibody in hepatitis B virus carriers and immune persons. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, 1990. 179(1), S. 49-60.
34. **Diao J., Churchill N. D., Michalak T. I.:** Complement-mediated cytotoxicity and inhibition of ligand binding to hepatocytes by woodchuck hepatitis virus-induced autoantibodies to asialoglycoprotein receptor. *Hepatology*, 1998. 27(6), S. 1623-31.
35. **Dienes H. P., Gerlich W. H., Worsdorfer M., Gerken G., Bianchi L., Hess G., Meyer zum Buschenfelde K. H.:** Hepatic expression patterns of the large and middle hepatitis B virus surface proteins in viremic and nonviremic chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 1990. 98(4), S. 1017-23.
36. **Engelke M., Mills K., Seitz S., Simon P., Gripon P., Schnolzer M., Urban S.:** Characterization of a hepatitis B and hepatitis delta virus receptor binding site. *Hepatology*, 2006. 43(4), S. 750-60.

37. **Fink L., Kinfe T., Seeger W., Ermert L., Kummer W., Bohle R. M.:**
Immunostaining for cell picking and real-time mRNA quantitation. *Am J Pathol*, 2000. 157(5), S. 1459-66.
38. **Fu T., Guo D., Huang X., O'Gorman M. R., Huang L., Crawford S. E., Soriano H. E.:** Apoptosis occurs in isolated and banked primary mouse hepatocytes. *Cell Transplant*, 2001. 10(1), S. 59-66.
39. **Gallina A., Gazina E., Milanesi G.:** A C-terminal PreS1 sequence is sufficient to retain hepatitis B virus L protein in 293 cells. *Virology*, 1995. 213(1), S. 57-69.
40. **Gatter K. C., Brown G., Trowbridge I. S., Woolston R. E., Mason D. Y.:** Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance. *J Clin Pathol*, 1983. 36(5), S. 539-45.
41. **Gerlich W., Thomssen R.:** Standardized detection of hepatitis B surface antigen: determination of its serum concentration in weight units per volume. *Dev Biol Stand*, 1975. 30, S. 78-87.
42. **Gerlich W. H., Deepen R., Heermann K. H., Krone B., Lu X. Y., Seifer M., Thomssen R.:** Protective potential of hepatitis B virus antigens other than the S gene protein. *Vaccine*, 1990. 8 Suppl, S. S63-8; discussion S79-80.
43. **Gerlich W. H., Heermann, K.H.:** Functions of Hepatitis B Virus Proteins and Virus Assembly. In: Hollinger F. B., Lemon, S. M., Margolis, H.S.: *Viral Hepatitis and Liver Disease*, 1. Aufl. 1991. Williams and Wilkins, Baltimore, USA. S. 121-134.
44. **Gerlich W. H., Schaefer, S.:** Hepadnaviren: Hepatitis-B-Virus. In: Doerr H. W., Gerlich, W.H.: *Medizinische Virologie*, 1. Aufl. 2002. Thieme, Stuttgart. S. 191-210.
45. **Glebe D., Berting A., Broehl S., Naumann H., Schuster R., Fiedler N., Tolle T. K., Nitsche S., Seifer M., Gerlich W. H., Schaefer S.:** Optimised conditions for the production of hepatitis B virus from cell culture. *Intervirology*, 2001. 44(6), S. 370-8.
46. **Glebe D., Aliakbari M., Krass P., Knoop E. V., Valerius K. P., Gerlich W. H.:** Pre-s1 antigen-dependent infection of Tupaia hepatocyte cultures with human hepatitis B virus. *J Virol*, 2003. 77(17), S. 9511-21.

47. **Glebe D., Urban S., Knoop E. V., Cag N., Krass P., Grun S., Bulavaite A., Sasnauskas K., Gerlich W. H.:** Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes. *Gastroenterology*, 2005. 129(1), S. 234-45.
48. **Glebe D.:** Attachment sites and neutralising epitopes of hepatitis B virus. *Minerva Gastroenterol Dietol*, 2006. 52(1), S. 3-21.
49. **Gripon P., Diot C., Guguen-Guillouzo C.:** Reproducible high level infection of cultured adult human hepatocytes by hepatitis B virus: effect of polyethylene glycol on adsorption and penetration. *Virology*, 1993. 192(2), S. 534-40.
50. **Gripon P., Rumin S., Urban S., Le Seyec J., Glaise D., Cannie I., Guyomard C., Lucas J., Trepo C., Guguen-Guillouzo C.:** Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(24), S. 15655-60.
51. **Gripon P., Cannie I., Urban S.:** Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by acylated peptides derived from the large viral surface protein. *J Virol*, 2005. 79(3), S. 1613-22.
52. **Guguen-Guillouzo C., Campion J. P., Brissot P., Glaise D., Launois B., Bourel M., Guillouzo A.:** High yield preparation of isolated human adult hepatocytes by enzymatic perfusion of the liver. *Cell Biol Int Rep*, 1982. 6(6), S. 625-8.
53. **Haque S., Haruna Y., Saito K., Nalesnik M. A., Atilasoy E., Thung S. N., Gerber M. A.:** Identification of bipotential progenitor cells in human liver regeneration. *Lab Invest*, 1996. 75(5), S. 699-705.
54. **Harris C. L., Toner M., Hubel A., Cravalho E. G., Yarmush M. L., Tompkins R. G.:** Cryopreservation of isolated hepatocytes: intracellular ice formation under various chemical and physical conditions. *Cryobiology*, 1991. 28(5), S. 436-44.
55. **Heermann K. H., Goldmann U., Schwartz W., Seyffarth T., Baumgarten H., Gerlich W. H.:** Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol*, 1984. 52(2), S. 396-402.

56. **Heermann K. H., Kruse F., Seifer M., Gerlich W. H.:** Immunogenicity of the gene S and Pre-S domains in hepatitis B virions and HBsAg filaments. *Intervirology*, 1987. 28(1), S. 14-25.
57. **Heermann K. H., Gerlich W. H., Chudy M., Schaefer S., Thomssen R.:** Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in two international reference plasma preparations. Eurohep Pathobiology Group. *J Clin Microbiol*, 1999. 37(1), S. 68-73.
58. **Herbst H., Frey A., Heinrichs O., Milani S., Bechstein W. O., Neuhaus P., Schuppan D.:** Heterogeneity of liver cells expressing procollagen types I and IV in vivo. *Histochem Cell Biol*, 1997. 107(5), S. 399-409.
59. **Hirsh M., Konijn A. M., Iancu T. C.:** Acquisition, storage and release of iron by cultured human hepatoma cells. *J Hepatol*, 2002. 36(1), S. 30-8.
60. **Hong H. J., Ryu C. J., Hur H., Kim S., Oh H. K., Oh M. S., Park S. Y.:** In vivo neutralization of hepatitis B virus infection by an anti-preS1 humanized antibody in chimpanzees. *Virology*, 2004. 318(1), S. 134-41.
61. **Hoofnagle J. H., Gerety R. J., Smallwood L. A., Barker L. F.:** Subtyping of hepatitis B surface antigen and antibody by radioimmunoassay. *Gastroenterology*, 1977. 72(2), S. 290-6.
62. **Hsu H. C., Lai M. Y., Su I. J., Chen D. S., Chang M. H., Yang P. M., Wu C. Y., Hsieh H. C.:** Correlation of hepatocyte HBsAg expression with virus replication and liver pathology. *Hepatology*, 1988. 8(4), S. 749-54.
63. **Iwai M., Kitagawa Y., Nakajima T., Takeda M., Okanoue T., Ogasawara T., Suyama Y., Miyoshi M., Kashima K.:** Clinical features, image analysis, and laparoscopic and histological liver findings in Budd-Chiari syndrome. *Hepatogastroenterology*, 1998. 45(24), S. 2359-68.
64. **Jaoude G. A., Sureau C.:** Role of the antigenic loop of the hepatitis B virus envelope proteins in infectivity of hepatitis delta virus. *J Virol*, 2005. 79(16), S. 10460-6.

65. **Jilg W., Delhoune C., Deinhardt F., Roumeliotou-Karayannis A. J., Papaevangelou G. J., Mushahwar I. K., Overby L. R.:** Hepatitis B surface antigen (HBsAg) subtype-specific antibodies in persons vaccinated against hepatitis B. *J Med Virol*, 1984. 13(2), S. 171-8.
66. **Junqueira L. C., Carneiro, J., Schiebler, T.H.:** Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 4. Aufl. 1996. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
67. **Kann M., Gerlich, W.H.:** Hepatitis B. In: Collier L., Balows, A., Sussmann, M.: *Microbiological and Microbial Infections. Vol.1*, 9. Aufl. 1998. Arnold, Hodder Headline Group, London. S. 745-773.
68. **Karavanova I. D., Bannikov G. A., Troianovskii S. M.:** [Differences in the expression of prekeratin and vimentin in organ and monolayer cultures of rat hepatocytes]. *Tsitologiya*, 1985. 27(9), S. 1039-42.
69. **Knowles B. B., Howe C. C., Aden D. P.:** Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*, 1980. 209(4455), S. 497-9.
70. **Köck J., Borst E. M., Schlicht H. J.:** Uptake of duck hepatitis B virus into hepatocytes occurs by endocytosis but does not require passage of the virus through an acidic intracellular compartment. *J Virol*, 1996. 70(9), S. 5827-31.
71. **Köck J., Nassal M., MacNelly S., Baumert T. F., Blum H. E., von Weizsacker F.:** Efficient infection of primary tupaia hepatocytes with purified human and woolly monkey hepatitis B virus. *J Virol*, 2001. 75(11), S. 5084-9.
72. **Koyama S., Sato Y., Hatakeyama K.:** The subcutaneous splenic transposition prevents liver injury induced by excessive portal pressure after massive hepatectomy. *Hepatogastroenterology*, 2003. 50(49), S. 37-42.
73. **Le Seyec J., Chouteau P., Cannie I., Guguen-Guillouzo C., Gripon P.:** Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain. *J Virol*, 1999. 73(3), S. 2052-7.

74. **Leoni G., Bogliolo L., Berlinguer F., Rosati I., Pintus P. P., Ledda S., Naitana S.:** Defined media for vitrification, warming, and rehydration: effects on post-thaw protein synthesis and viability of in vitro derived ovine embryos. *Cryobiology*, 2002. 45(3), S. 204-12.
75. **Lindl T., Bauer, J.:** Zell- und Gewebekultur. Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. 1. Aufl. 1987. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
76. **Lu X., Block T. M., Gerlich W. H.:** Protease-induced infectivity of hepatitis B virus for a human hepatoblastoma cell line. *J Virol*, 1996. 70(4), S. 2277-85.
77. **Mabit H., Vons C., Dubanchet S., Capel F., Franco D., Petit M. A.:** Primary cultured normal human hepatocytes for hepatitis B virus receptor studies. *J Hepatol*, 1996. 24(4), S. 403-12.
78. **Mack J. E., Kerr J. A., Vreugdenhil P. K., Belzer F. O., Southard J. H.:** Effect of polyethylene glycol on lipid peroxidation in cold-stored rat hepatocytes. *Cryobiology*, 1991. 28(1), S. 1-7.
79. **Mamprin M. E., Guibert E. E., Rodriguez J. V.:** Glutathione content during the rinsing and rewarming process of rat hepatocytes preserved in University of Wisconsin solution. *Cryobiology*, 2000. 40(3), S. 270-6.
80. **Marceau N., Loranger A.:** Cytokeratin expression, fibrillar organization, and subtle function in liver cells. *Biochem Cell Biol*, 1995. 73(9-10), S. 619-25.
81. **Markwell M. A., Portner A., Schwartz A. L.:** An alternative route of infection for viruses: entry by means of the asialoglycoprotein receptor of a Sendai virus mutant lacking its attachment protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. 82(4), S. 978-82.
82. **Morgan E. H.:** Specificity of hepatic iron uptake from plasma transferrin in the rat. *Comp Biochem Physiol A*, 1991. 99(1-2), S. 91-5.
83. **Nakabayashi H., Taketa K., Miyano K., Yamane T., Sato J.:** Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res*, 1982. 42(9), S. 3858-63.

84. **Naoumov N. V., Antonov K. A., Miska S., Bichko V., Williams R., Will H.:** Differentiation of core gene products of the hepatitis B virus in infected liver tissue using monoclonal antibodies. *J Med Virol*, 1997. 53(2), S. 127-38.
85. **Neurath A. R., Kent S. B., Parker K., Prince A. M., Strick N., Brotman B., Sproul P.:** Antibodies to a synthetic peptide from the preS 120-145 region of the hepatitis B virus envelope are virus neutralizing. *Vaccine*, 1986a. 4(1), S. 35-7.
86. **Neurath A. R., Kent S. B., Strick N., Parker K.:** Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell*, 1986b. 46(3), S. 429-36.
87. **Neurath A. R., Seto B., Strick N.:** Antibodies to synthetic peptides from the preS1 region of the hepatitis B virus (HBV) envelope (env) protein are virus-neutralizing and protective. *Vaccine*, 1989. 7(3), S. 234-6.
88. **Nokubo M., Nagy I., Kitani K., Ohta M.:** Characterization of the autofluorescence of rat liver plasma membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1988. 939(3), S. 441-8.
89. **Owada T., Matsubayashi K., Sakata H., Ihara H., Sato S., Ikebuchi K., Kato T., Azuma H., Ikeda H.:** Interaction between desialylated hepatitis B virus and asialoglycoprotein receptor on hepatocytes may be indispensable for viral binding and entry. *J Viral Hepat*, 2006. 13(1), S. 11-8.
90. **Pagan R., Martin I., Llobera M., Vilaro S.:** Epithelial-mesenchymal transition of cultured rat neonatal hepatocytes is differentially regulated in response to epidermal growth factor and dimethyl sulfoxide. *Hepatology*, 1997. 25(3), S. 598-606.
91. **Paran N., Cooper A., Shaul Y.:** Interaction of hepatitis B virus with cells. *Rev Med Virol*, 2003. 13(3), S. 137-43.
92. **Pepe G., Cifarelli A., Paradisi F., De Ritis F.:** HBsAg uptake by macrophages in vitro: an immunofluorescence study. *Experientia*, 1979. 35(3), S. 382-384.
93. **Piperno G., LeDizet M., Chang X. J.:** Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *J Cell Biol*, 1987. 104(2), S. 289-302.

94. **Pontecorvo G.:** Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment. *Somatic Cell Genet*, 1975. 1(4), S. 397-400.
95. **Pontisso P., Petit M. A., Bankowski M. J., Peeples M. E.:** Human liver plasma membranes contain receptors for the hepatitis B virus pre-S1 region and, via polymerized human serum albumin, for the pre-S2 region. *J Virol*, 1989a. 63(5), S. 1981-8.
96. **Pontisso P., Ruvoletto M. G., Gerlich W. H., Heermann K. H., Bardini R., Alberti A.:** Identification of an attachment site for human liver plasma membranes on hepatitis B virus particles. *Virology*, 1989b. 173(2), S. 522-30.
97. **Possehl C.:** Untersuchungen zu Strukturproteinen des Hepatitis-B-Virus. Dissertation, Göttingen 1994.
98. **Prince A. M.:** An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1968. 60(3), S. 814-21.
99. **Qiao M., Macnaughton T. B., Gowans E. J.:** Adsorption and penetration of hepatitis B virus in a nonpermissive cell line. *Virology*, 1994. 201(2), S. 356-63.
100. **Ray M. B., Desmet V. J.:** Distribution patterns of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in the liver biopsies of hepatitis B patients. *Acta Gastroenterol Belg*, 1976. 39(9-10), S. 307-17.
101. **Reaven E. P., Cheng Y., Miller M. D.:** Quantitative analysis of tubulin and microtubule compartments in isolated rat hepatocytes. *J Cell Biol*, 1977. 75(3), S. 731-42.
102. **Ren S., Nassal M.:** Hepatitis B virus (HBV) virion and covalently closed circular DNA formation in primary tupaia hepatocytes and human hepatoma cell lines upon HBV genome transduction with replication-defective adenovirus vectors. *J Virol*, 2001. 75(3), S. 1104-16.
103. **Rodriguez J. V., Mamprin M. E., Mediavilla M. G., Guibert E. E.:** Glutathione movements during cold preservation of rat hepatocytes. *Cryobiology*, 1998. 36(3), S. 236-44.

104. **Ryu C. J., Gripon P., Park H. R., Park S. S., Kim Y. K., Guguen-Guillouzo C., Yoo O. J., Hong H. J.:** In vitro neutralization of hepatitis B virus by monoclonal antibodies against the viral surface antigen. *J Med Virol*, 1997. 52(2), S. 226-33.
105. **Saito M., Ohnishi K., Terabayashi H., Tanaka H., Iida S., Nomura F.:** Measurement of intrahepatic pressure as an index of hepatic sinusoidal pressure. *Am J Gastroenterol*, 1987. 82(10), S. 1057-61.
106. **Schmitz J., Ohme M., Zischler H.:** The complete mitochondrial genome of *Tupaia belangeri* and the phylogenetic affiliation of scandentia to other eutherian orders. *Mol Biol Evol*, 2000. 17(9), S. 1334-43.
107. **Schuetz E. G., Li D., Omiecinski C. J., Muller-Eberhard U., Kleinman H. K., Elswick B., Guzelian P. S.:** Regulation of gene expression in adult rat hepatocytes cultured on a basement membrane matrix. *J Cell Physiol*, 1988. 134(3), S. 309-23.
108. **Schulze-Bergkamen H., Untergasser A., Dax A., Vogel H., Buchler P., Klar E., Lehnert T., Friess H., Buchler M. W., Kirschfink M., Stremmel W., Krammer P. H., Muller M., Protzer U.:** Primary human hepatocytes--a valuable tool for investigation of apoptosis and hepatitis B virus infection. *J Hepatol*, 2003. 38(6), S. 736-44.
109. **Seglen P. O.:** Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol*, 1976. 13, S. 29-83.
110. **Sells M. A., Chen M. L., Acs G.:** Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. 84(4), S. 1005-9.
111. **Shiga A., Shirota K.:** Vimentin/cytokeratin coexpression foci in a well-differentiated canine hepatocellular carcinoma. *J Vet Med Sci*, 2000. 62(2), S. 199-202.
112. **Sikuler E., Kravetz D., Groszmann R. J.:** Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model. *Am J Physiol*, 1985. 248(6 Pt 1), S. G618-25.

113. **Sominskaya I., Pushko P., Dreilina D., Kozlovskaya T., Pumpen P.:** Determination of the minimal length of preS1 epitope recognized by a monoclonal antibody which inhibits attachment of hepatitis B virus to hepatocytes. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, 1992. 181(4), S. 215-26.
114. **Spiess M.:** The asialoglycoprotein receptor: a model for endocytic transport receptors. *Biochemistry*, 1990. 29(43), S. 10009-18.
115. **Stephenne J.:** Development and production aspects of a recombinant yeast-derived hepatitis B vaccine. *Vaccine*, 1990. 8 Suppl, S. S69-73; discussion S79-80.
116. **Stibbe W., Gerlich W. H.:** Characterization of pre-s gene products in hepatitis B surface antigen. *Dev Biol Stand*, 1983. 54, S. 33-43.
117. **Su J. J.:** [Experimental infection of human hepatitis B virus (HBV) in adult tree shrews]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 1987. 16(2), S. 103-6, 22.
118. **Tennant B. C., Gerin J. L.:** The woodchuck model of hepatitis B virus infection. *Hep J*, 2001. 42(2), S. 89-102.
119. **Thorstensen K., Romslo I.:** Uptake of iron from transferrin by isolated hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1984. 804(2), S. 200-8.
120. **Tong S., Li J., Wands J. R.:** Carboxypeptidase D is an avian hepatitis B virus receptor. *J Virol*, 1999. 73(10), S. 8696-702.
121. **Treichel U., Meyer zum Buschenfelde K. H., Stockert R. J., Poralla T., Gerken G.:** The asialoglycoprotein receptor mediates hepatic binding and uptake of natural hepatitis B virus particles derived from viraemic carriers. *J Gen Virol*, 1994. 75 (Pt 11), S. 3021-9.
122. **Treichel U., Meyer zum Buschenfelde K. H., Dienes H. P., Gerken G.:** Receptor-mediated entry of hepatitis B virus particles into liver cells. *Arch Virol*, 1997. 142(3), S. 493-8.
123. **Urban S., Breiner K. M., Fehler F., Klingmuller U., Schaller H.:** Avian hepatitis B virus infection is initiated by the interaction of a distinct pre-S subdomain with the cellular receptor gp180. *J Virol*, 1998. 72(10), S. 8089-97.

124. **Urban S., Gripon P.:** Inhibition of duck hepatitis B virus infection by a myristoylated pre-S peptide of the large viral surface protein. *J Virol*, 2002. 76(4), S. 1986-90.
125. **Walter E., Keist R., Niederost B., Pult I., Blum H. E.:** Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo. *Hepatology*, 1996. 24(1), S. 1-5.
126. **Wang S. S., Su J. J., Zhang H. Y., Li Y., Zhang T., Wang Y. C., Huang G. Y., Qin L. L., Ge X. M., Yu Y., Li H. M.:** [Human hepatitis B virus infection of tree shrews and *Macaca assamensis* in vivo]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*, 2003. 17(1), S. 21-4.
127. **Waters J. A., Brown S. E., Steward M. W., Howard C. R., Thomas H. C.:** Analysis of the antigenic epitopes of hepatitis B surface antigen involved in the induction of a protective antibody response. *Virus Res*, 1992. 22(1), S. 1-12.
128. **Weigel P. H., Oka J. A.:** Temperature dependence of endocytosis mediated by the asialoglycoprotein receptor in isolated rat hepatocytes. Evidence for two potentially rate-limiting steps. *J Biol Chem*, 1981. 256(6), S. 2615-7.
129. **Yan R. Q., Su J. J., Huang D. R., Gan Y. C., Yang C., Huang G. H.:** Human hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. I. Experimental infection of tree shrews with hepatitis B virus. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1996. 122(5), S. 283-8.
130. **Zhou F. J., Hu Z. L., Dai J. X., Chen R. W., Shi K., Lin Y., Sun S. H.:** Protection of tree shrews by pVAX-PS DNA vaccine against HBV infection. *DNA Cell Biol*, 2003. 22(7), S. 475-8.

7. Abkürzungsverzeichnis

Die allgemein geläufigen Maßeinheiten Gramm (g), Meter (m), Liter (l) und Mol (mol), sowie die daraus abgeleiteten Einheiten wurden wie üblich abgekürzt, chemische Elemente und Aminosäuren gemäß internationaler Nomenklatur.

“	Zoll
Abb.	Abbildung
AIDS	akquiriertes Immundefizienz-Syndrom
al.	altera
Anti-HBc	Antikörper gegen Hepatitis B-Virus core Antigen
Anti-HBs	Antikörper gegen Hepatitis B-Virus surface Antigen
APAAP	Alkalische Phosphatase - Anti-Alkalische Phosphatase
ASGPR	Asialoglykoproteinrezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
Ax	AlexaFluor
bidest.	bidestillata
BSA	bovines Serum-Albumin
ca.	circa
CD	cluster of differentiation
cccDNA	covalently closed circular DNA
CK	Zytokeratin
d	Tag
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DABCO	1,4-Diazabicyclo(2.2.2.)octan
DHBV	Duck Hepatitis B-Virus
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DuPreS2-41 ^{myr}	myristoyliertes Duck Hepatitis B-Virus PreS2-41-Protein
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat

FKS	fetales Kälberserum
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
G	Gauge
<i>ge</i>	Genomäquivalente (genome equivalents)
gp	Glykoprotein
h	Stunde(n)
HBcAg	Hepatitis B-Virus core Antigen
HBcAg	Hepatitis B-Virus e Antigen
HBsAg	Hepatitis B-Virus surface Antigen
HBV	Hepatitis B-Virus
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
HuPreS2-48 ^{myr}	myristoyliertes Hepatitis B-Virus PreS2-48-Protein
JLU	Justus-Liebig-Universität
kD	Kilodalton
LDHBs	Large Duck Hepatitis B-Virus surface Antigen
LHBs	Large Hepatitis B-Virus surface Antigen
MHBs	Middle Hepatitis B-Virus surface Antigen
min	Minute(n)
MOI	multiplicity of infection
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	messenger-RNA
MW	Molekulargewicht
p	Protein
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
p.i.	post infectionem
PRH	primäre Rattenhepatozyten
PTH	primäre Tupaiahepatozyten
rcDNA	relaxed circular DNA
RNA	Ribonukleinsäure
rT	reverse Transkriptase
RT-PCR	reverse transcription Polymerase-Kettenreaktion

s.	siehe
SHBs	small Hepatitis B-Virus surface Antigen
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SVP	subvirale Partikel
UW-Lösung	University of Wisconsin-Lösung
V.	Vena
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen-Volumen-Verhältnis
WHV	Woodchuck Hepatitis Virus
w/v	Gewicht-Volumen-Verhältnis
ZK-Schale	Zellkulturschale

8. Lebenslauf

Peter Kraß

geboren am 03.09.1978 in Steinfurt-Borghorst

Vater: Günter Kraß, †

Mutter: Gisela Kraß, geb. Potthast

Zwei Geschwister

1985-1998 Schulausbildung: Mariengrundschule Borghorst, Städtisches
Gymnasium Borghorst

1998 Abitur

1998-1999 Zivildienst am Marienhospital Borghorst

09/1999 - 05/2006 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität
Gießen

08/2001 Ärztliche Vorprüfung

03/2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

03/2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

05/2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

ab 04/2002 Wissenschaftliche Arbeit am Institut für Medizinische Virologie
der JLU Gießen bei Prof. W.H. Gerlich u. Dr. D. Glebe

10/2002 - 12/2002 Tätigkeit als Studentische Hilfskraft am Institut für Medizinische
Virologie der JLU Gießen

09/2005 - 02/2006 Unterrichtstätigkeit in der Krankenpflegeschule am Lehrinstitut
für Gesundheitsberufe am Klinikum Bad Hersfeld

09.05.2006 Approbation als Arzt

seit 06/2006 Assistenzarzt in der Abteilung für Innere Medizin am Klinikum
Merseburg / Bereich Querfurt

Publikationen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften:

1. **Glebe D., Aliakbari M., Krass P., Knoop E. V., Valerius K. P., Gerlich W. H.:**
Pre-s1 antigen-dependent infection of Tupaia hepatocyte cultures with human hepatitis B virus. *J Virol*, 2003. 77(17), S. 9511-21.

2. **Glebe D., Urban S., Knoop E. V., Cag N., Krass P., Grun S., Bulavaite A., Sasnauskas K., Gerlich W. H.:** Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes.
Gastroenterology, 2005. 129(1), S. 234-45.

9. D a n k s a g u n g

Die Anfertigung dieser Doktorarbeit wäre ohne die Unterstützung zahlreicher Personen, sowohl im fachlichen als auch im privaten Bereich, nicht möglich gewesen. Folgenden Personen möchte ich hiermit im Besonderen danken:

Herrn Prof. Gerlich für die ausgezeichnete fachliche Betreuung und Unterstützung, sowie das immer wieder geduldige, aufmerksame und kritische Lesen diverser Manuskripte.

Herrn Dr. Dieter Glebe für die ebenfalls exzellente fachliche und menschliche Betreuung und sorgsame Leitung, kritische und anregende Diskussionen, und ständig neue Ideen („*ich hab da noch was...*“).

Herrn Prof. Chakraborty für die zur Verfügung Stellung des Mikroskops inklusive der Kamera in seinem Institut.

Herrn Prof. Bohle für die Anfertigung und Überlassung der histopathologischen Bilder einer akuten HBV-Infektion beim Menschen, sowie seine fachlichen Anmerkungen hierzu, außerdem für die großzügige Versorgung mit Hämalaun.

Herrn PD Dr. Urban für die zur Verfügung Stellung der PräS-Peptide.

Herrn Prof. Bein für die Überlassung HBV-positiver Blutspenden, und natürlich ganz besonders den HBV-infizierten Personen, die bereitwillig ihr Blut gespendet haben.

Herrn Prof. von Holst und Herrn Dr. Valerius für die Bereitstellung ihrer geliebten Tupaias, obwohl sie sehr wohl wußten, welches Schicksal sie erwarten würde.

Eva Knoop und Mehriar Aliakbari für die wundervolle Zusammenarbeit im Team, ihren Humor in allen Lebenslagen, und die geistige Unterstützung. Ihr seid die Besten, Mädels! Eva Knoop sei noch explizit für die tiermedizinische Betreuung der Tupaias gedankt.

Siggi Bröhl, die gute Seele und Herzstück des Labors, für die unendlich vielen Arbeiten, die sie mir abgenommen hat, und natürlich für die Einführung in die Geheimnisse der Zellkultur.

Den Mitarbeiterinnen aus der virologischen Diagnostik für diverse laborchemische Untersuchungen.

Allen anderen Doktorandinnen und Doktoranden, Diplomandinnen und Diplomanden, und sonstigen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Virologie.

Den Tierpflegerinnen und -pflegern, die sich so umsichtig und liebevoll um die Tupaia, Ratten und sonstige Tiere kümmern.

Meiner geliebten Freundin Sandra Mosinski ganz besonders, da sie mir immer wieder neue Kraft gibt. Du bist mein allergrößter Schatz!! In fachlicher Hinsicht ist ihr vor allem für die Einführung in die Immunzytochemie zu danken, ohne die viele wundervolle Bilder und Ergebnisse nicht zustande gekommen wären.

Meinen Eltern für all ihre Unterstützung.

Katja „Mutti“ Schmidt fürs Sein, für viele faszinierende Erklärungen diversester Sachverhalte („*Biologen erklären die Welt*“), und die stetige Sorge um das physische und psychische Wohl all ihrer Schäfchen.

10. E r k l ä r u n g

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

(Peter Kraß)